

VORBEHANDLUNG UND HYDROLYSE AGRARISCHER RESTSTOFFE FÜR DIE STOFFLICHE BIOMASSENUTZUNG

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jörn Oetken
aus Wildeshausen

1. Referent:	Professor Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent:	Professor Dr. Peter Winterhalter
eingereicht am:	28.10.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	07.02.2020

Druckjahr 2020

VORVERÖFFENTLICHUNG DER DISSERTATION

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

TAGUNGSBEITRÄGE

J. Oetken, H. Storz, U. Prüße: Optimization of common chemical pretreatments to enhance the enzymatic hydrolysis of wheat chaff. (Poster) 12th International Conference on Renewable Resources and Biorafineries, Ghent, Belgien 2016

J. Oetken, H. Storz: Möglichkeiten und Technologien für die stoffliche Nutzung agrarischer Reststoffe. (Vortrag) Innovationsforum SpreuStroh, Chemnitz, 2016

S. Krull, L. Eidt, A. Hevekerl, A. Kuenz, J. Oetken, H. Storz, U. Prüße: Biotechnological itaconic acid production from wheat chaff hydrolysate. (Poster) 12th International Conference on Renewable Resources and Biorafineries, Ghent, Belgien 2016

Inhaltsverzeichnis

VORVERÖFFENTLICHUNG DER DISSERTATION	I
1. EINLEITUNG.....	4
2. AUFGABENSTELLUNG	9
3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	10
3.1. NACHWACHSENDE, AGRARISCHE ROH- UND RESTSTOFFE	10
3.1.1. CELLULOSE.....	11
3.1.2. HEMICELLULOSE	12
3.1.3. LIGNIN.....	13
3.2. VORBEHANDLUNGEN.....	15
3.2.1. PHYSIKALISCH/MECHANISCH.....	15
3.2.2. CHEMISCH/THERMOCHEMISCH.....	16
3.3. HYDROLYSE.....	19
3.4. ROHSTOFFE: KAFF UND STROH	21
4. MATERIAL & METHODEN.....	24
4.1. ROHSTOFFCHARAKTERISIERUNG.....	24
4.1.1. WASSERGEHALT	24
4.1.2. ZUCKERGEHALT	24
4.1.3. LIGNINGEHALT	24
4.1.4. STICKSTOFFGEHALT.....	25
4.1.5. ASCHEGEHALT.....	25
4.2. ENZYMCHARAKTERISIERUNG.....	26
4.3. VORBEHANDLUNGEN.....	26
4.3.1. MECHANISCHE VORBEHANDLUNG	26
4.3.2. THERMOCHEMISCHE VORBEHANDLUNG	27
4.4. ENZYMATISCHE HYDROLYSE.....	30
4.5. ANALYTIK MITTELS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIE (HPLC).....	32

4.5.1.	ZUCKER ANALYTIK.....	32
4.5.2.	NEBENPRODUKTANALYTIK.....	34
4.6.	AUSWERTUNG.....	35
5.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	36
5.1.	ROHSTOFFCHARAKTERISIERUNG VON KAFF UND STROH.....	36
5.1.1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	42
5.2.	MECHANISCHE VORBEHANDLUNG VON KAFF.....	42
5.2.1.	EINFLUSS PARTIKELGRÖÖE.....	43
5.2.2.	EINFLUSS MÜHLENTYP.....	44
5.2.3.	ZUSAMMENFASSUNG.....	46
5.3.	VERGLEICH DER THERMOCHEMISCHEN REAKTIONSSYSTEME.....	47
5.4.	OPTIMIERUNG DER THERMO-CHEMISCHEN VORBEHANDLUNG VON KAFF.....	49
5.4.1.	SÄUREKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG.....	50
5.4.2.	NEUTRALE BZW. LÖSEMittelKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG.....	56
5.4.3.	BASENKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG.....	59
5.4.4.	ZUSAMMENFASSUNG.....	68
5.5.	BILANZEN DER BESTEN VORBEHANDLUNGEN.....	70
5.5.1.	ZUSAMMENFASSUNG.....	74
5.6.	OPTIMIERUNG DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE.....	75
5.6.1.	BESTIMMUNG DER ENZYM-AKTIVITÄTsoPTIMA VON BIOGAZYME 2X.....	75
5.6.2.	HYDROLYSEDAUER.....	76
5.6.3.	EINGESETZTE ENZYMMENGE.....	78
5.6.4.	EINFLUSS VON NEBENPRODUKTEN.....	81
5.6.5.	EINFLUSS DES FESTSTOFFGEHALTES.....	83
5.6.6.	OPTIMIERUNG DER GERÜHRTEN HYDROLYSE.....	84
5.6.7.	ZUSAMMENFASSUNG.....	87
6.	ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK.....	88
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
8.	ANHANG.....	107

A	ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN	107
B	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
C	TABELLENVERZEICHNIS	111
D	SYMBOL UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	113
E	CHEMIKALIEN	115

1. EINLEITUNG

Der weltweit steigende Energiebedarf und der prognostizierte Mangel an fossilen Rohstoffen führen dazu, dass Alternativen für petrochemische Produkte und für die Energiegewinnung gefunden werden müssen. Für die energetische Nutzung sind bereits aussichtsreiche Alternativen wie Solar-, Wind- und Wasserenergie verfügbar. Für die stoffliche Nutzung, also der Ersatz von Öl für z.B. die Kunststoff-, oder Kraftstoffchemie ist bis jetzt noch keine zufriedenstellende Alternative verfügbar da sie im Vergleich zu petrochemischen Produkten noch zu kostenintensiv sind. (Wyman 2007, Keim and Röper 2010, Brosowski, Adler et al. 2015)

Bereits im 19. Jahrhundert waren viele Ressourcen nur begrenzt verfügbar, wodurch nachwachsende Rest- und Rohstoffe (NaWaRos) in den Fokus der Wissenschaft rückten und die Hydrolyse von Holz erforscht wurde. Prinzipiell sind zwei Wege für die Hydrolyse möglich. Zum einen können die Hölzer chemisch oder enzymatisch in freie Kohlenhydrate umgesetzt werden, die im Anschluss an die Hydrolyse erneut durch eine chemische oder biotechnologische Konversion in andere Chemikalien überführt werden können. Vor mehr als 100 Jahren wurde bereits in Schweden Sulfite-Ethanol aus hydrolysiertem Fichtenholz gewonnen. Die Entwicklung der Holzhydrolyse begann in Deutschland mit dem Ausbruch des ersten Weltkrieges, doch wegen der verbesserten Rohstoffverfügbarkeit nach dem Krieg wurden die Forschungen wieder eingestellt. Mit dem Beginn der Weltwirtschaftskrise und den Vorbereitungen des 2. Weltkrieges verknappten sich viele Ressourcen, u.a. Ethanol was für eine Vielzahl von Produkten genutzt wurde. In dieser Zeit waren Wissenschaftler wie Heinrich Scholler und Friedrich Bergius die Pioniere, die es ermöglichten Holz zu hydrolysieren und die gewonnen Zucker anschließend in Ethanol umzusetzen. Ihre Prozesse beruhten auf Patenten aus dem Jahr 1880 von Dautzville und wurden weiterentwickelt, sodass vor und während des Krieges mehrere großtechnische Ethanol-Anlagen mit den Prozessen von Scholler und Bergius errichtet wurden. Durch den Bergius-Rheinau Prozess konnten mittels konzentrierter Salzsäure in zwei Hydrolysestufen Glucoseausbeuten von > 95 % erreicht werden. Der Scholler-Prozess hingegen verwendete verdünnte Schwefelsäure und erzielte Glucoseausbeuten zwischen 75-80 %. Die Verwendung von Säuren bei diesen Prozessen bringt jedoch erhebliche Nachteile mit sich. So entstehen als Nebenprodukte Aldehyde, Phenole und organische Säuren, die eine toxische Wirkung

auf Mikroorganismen haben und somit eine biotechnologische Konversion erheblich erschweren. Mittels Downstream-Prozessen können die Abbauprodukte zwar entfernt werden, dies generiert jedoch zusätzliche Kosten, was sich negativ auf den Gesamtprozess auswirkt. Des Weiteren sind aufgrund der Säuren spezielle Reaktormaterialien und Konstruktionen notwendig, um den korrosiven Eigenschaften der Säuren Stand zu halten. Auch die Rückgewinnung der Säuren ist nur durch einen hohen technischen Aufwand möglich. Aufgrund der Nachteile des Prozesses und durch das Vorhandensein von im Vergleich günstigen ölbasierten Produkten in den Nachkriegsjahren, wurden die errichteten Werke wieder geschlossen und die Forschung und Weiterentwicklung der Prozesse fand nur schleppend statt. (Scholler 1937, Kollmann 1951, Wenzl Hermann 1954, Specht 1955, Wyman, Dale et al. 2005, Wyman 2007)

Dank des wachsenden Bewusstseins über Nachhaltigkeit und des Umdenkens hinsichtlich des Klimawandels steht fest, dass Alternativen für petrochemische Produkte gefunden werden müssen. Der erste Ansatz dazu war die Entwicklung der sogenannten „First-Generation Biofuels“. Hierfür werden Rohstoffe wie z.B. Zucker aus der Zuckerrübe, Stärke aus Mais oder auch Öle aus Raps hydrolysiert und weiterverwendet. Hierbei entsteht jedoch ein Konflikt, da alle eingesetzten Stoffe auch in der Lebens- und Futtermittelproduktion eingesetzt werden können und somit entsteht eine direkte Konkurrenz zwischen den Verwendungsmöglichkeiten. Um keine Teller-Tank Debatte zu entfachen und somit nicht in Konkurrenz zur Lebens- und Futtermittelproduktion zu treten, müssen Alternativen für diese Rohstoffe gefunden werden. Die wiederentdeckte vielversprechende Möglichkeit ist dabei die Verwendung der NaWaRos (z.B. Stroh, Kaff, Holzreste usw.). Da das Grundgerüst der nachwachsenden Roh- und Reststoffe aus Lignocellulose besteht, die durch eine Vorbehandlung und Hydrolyse in freie, fermentierbare Zucker umgesetzt werden können, ist dies ein idealer Rohstoff. Die freigesetzten Zucker können im Anschluss, wie schon bei Scholler und Bergius, durch eine anschließende biotechnologische oder chemische Konversion in Plattformchemikalien (wie z.B. Ethanol, Aceton, Butanol, Fumar- und Mischsäure) überführt werden, die wie die petrochemischen Alternativen weiterverwendet werden können. Werden diese nachhaltigen Ressourcen eingesetzt, um Chemikalien und Treibstoffe herzustellen, spricht man „Second-Generation Biofuels“. (Wyman 2007, Yang and Wyman 2008, Binder and Raines 2010, Zhang, Tong et al. 2014, Brosowski, Adler et al. 2015, Wang, Wang et al. 2016)

Ziel muss also sein, einen industriell noch ungenutzten Rohstoff zu verwenden, der für die biotechnologische oder chemische Konversion nutzbar gemacht werden kann

und ihn anschließend in eine biobasierte Wertschöpfungskette einzugliedern. Das bedeutet, dass die gewonnenen Zucker in Chemikalien überführt werden müssen, die derzeit noch aus petrochemischer Herstellung stammen. So können bestehende Fabriken und Raffinerien weiter genutzt werden und es müssen keine neuen Produkte entwickelt werden. Diese Implementierung von NaWaRos in bestehende Prozesse, also der Aufbau einer biobasierten Wertschöpfungskette ist in Abbildung 1-1 dargestellt.

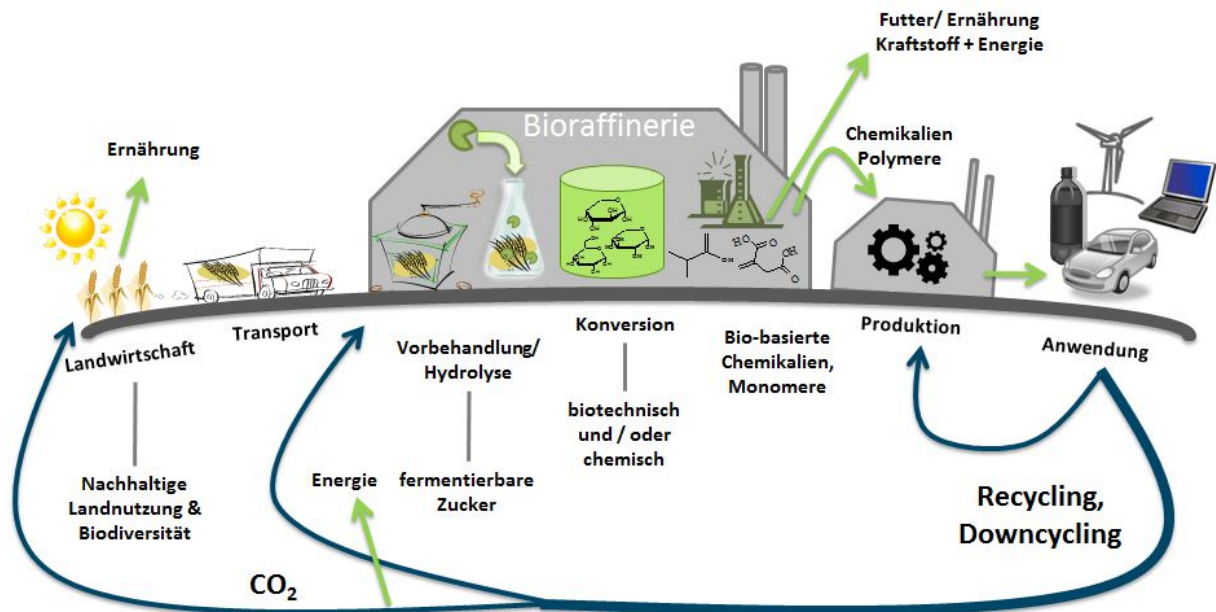


ABBILDUNG 1-1 EINE MÖGLICHE BIOBASIERTE WERTSCHÖPFUNGSKETTE

Am Beispiel von Weizen wird verdeutlicht, dass das Weizenkorn in der Lebens- und Futtermittelproduktion eingesetzt wird und die Reststoffe wie das Kaff und ein Teil des Strohs wird in eine Bioraffinerie transportiert, wo es zerkleinert, vorbehandelt und zu fermentierbaren Zuckern konvertiert wird. Diese werden biotechnologisch oder chemisch zu biobasierten Chemikalien umgesetzt und können in verschiedenen Produktionswegen weiterverwendet werden. Für eine nachhaltige Wertschöpfungskette müssen die Anwendungen anschließend recycelt werden. Durch solch einen nachhaltigen Kreislauf werden petrochemische Produkte ersetzt und auch der Ausstoß des Treibhausgases CO₂ wird im Vergleich zu ölbasierten Produkten stark minimiert, da beim Recycling nur das CO₂ abgegeben wird, dass die Pflanzen zuvor aus der Luft aufgenommen haben. (Wyman 1994)

Heutzutage ist eine Vielzahl von Pilotanlagen für die Vorbehandlung und Hydrolyse von NaWaRos auf der Welt vorhanden. Das Fraunhofer Institut CBP (Leuna) hat eine Pilotanlage für die Vorbehandlung und Fraktionierung von Lignocellulose errichtet

und nutzt das Organosolv-Verfahren, um die Kohlenhydrate zu fraktionieren und anschließend enzymatisch zu hydrolysieren. Eine Bioraffinerie im kommerziellen Maßstab für aus Cellulose hergestellten Ethanol wurde 2014 von den Firmen POET-DSM Advanced Biofuels in Emmetsburg, Iowa, USA eröffnet. In dieser Anlage werden Maiskolben, -blätter, -stängel sowie Stroh mithilfe des Liquid Hot Water (LHW) Prozesses vorbehandelt und anschließend hydrolysiert. Laut Angaben von POET-DSM können so bis zu 770 t Biomasse jeden Tag zu Ethanol umgesetzt werden. (Michels 2014, Ward 2015)

Eine hohe Fluktuation an neu errichteten und wieder geschlossenen weltweiten Pilotanlagen zeigen jedoch, dass eine effektive und somit wirtschaftliche Alternative noch nicht gefunden wurde und somit weiter ein hoher Forschungsbedarf besteht.

Das Problem das bei der Nutzung von NaWaRos noch nicht ausreichend gelöst werden konnte ist, dass die Struktur der Materialien nur durch aufwendige und meist kostenintensive Prozesse aufgebrochen werden kann. Dies liegt an der sehr komplex aufgebauten Lignocellulosestruktur der nachwachsenden Rohstoffe. Lignocellulose besteht aus drei Hauptkomponenten: der Cellulose, der Hemicellulose sowie dem Lignin das als „Klebstoff“ zwischen den Komponenten dient. Um die Struktur aufzubrechen sind verschiedene Techniken möglich. Zu den bekannten und oft verwendeten Prozessen zählen die mechanische Zerkleinerung und die thermochemische Vorbehandlung. Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen und die kovalenten Bindungen zwischen den Komponenten gespalten. (Pérez, Ballesteros et al. 2008, Kumar, Barrett et al. 2009, Sanchez, Magaña et al. 2014, Kumar, Gautam et al. 2016)

Die mechanische Vorbehandlung kann notwendig sein, um z.B. lange Strohhalme zu zerkleinern und so für Folgeprozesse vorzubereiten. Des Weiteren ist ein Hauptgrund für die mechanische Zerkleinerung die Vergrößerung der Oberfläche, damit Chemikalien leichter in die Strukturen eindringen können und im Folgeprozess Enzyme leichter an die Kohlenhydratpolymere gelangen. Ob Proben vermahlen werden müssen und welche Mühle dafür verwendet wird, ist rohstoffabhängig und muss im Einzelnen untersucht werden.

Die thermochemische Vorbehandlung verfolgt das Ziel, die Verknüpfungen der drei Hauptkomponenten voneinander zu trennen und ggf. zu fraktionieren, damit eine effektive Hydrolyse möglich ist. Dabei kann die Behandlung mittels Säuren, Basen, Lösemitteln und/oder Hitze erfolgen. Bei jedem Prozess entstehen unterschiedliche Abbauprodukte die z.T. mikrobiologisch hemmende Eigenschaften aufweisen. Daher

muss für jeden Rohstoff individuell untersucht werden, welches Verfahren das geeignetste ist, um bei gleichzeitiger Vermeidung von Abbauprodukten eine optimale Vorbehandlung für die Hydrolyse zu gewährleisten. Durch die Verwendung von Säuren kann die Vorbehandlung sowie die Hydrolyse der polymeren Verbindungen erfolgen, dabei müssen diese beiden Schritte separat betrachtet werden, da während der Vorbehandlung im Gegensatz zur Hydrolyse möglichst wenig Zuckermonomere entstehen sollen. Die Nachteile der säurekatalysierten Hydrolyse liegen in der Produktion von störenden Nebenprodukten sowie in den korrosiven Eigenschaften der Säuren, was dazu führt, dass die säurekatalysierte Hydrolyse nicht mehr verwendet wird.

Durch die Entdeckung der enzymatischen Hydrolyse wurde diese, seit den 50er Jahren, intensiv erforscht und dient als Standardverfahren für die Hydrolyse von Biomasse. Dieses Verfahren ist jedoch noch nicht vollständig untersucht und optimiert, da Probleme mit Enzym-Produkt-Hemmung bei hohen Zuckerkonzentrationen, Substrat-Enzym-Adsorption, Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymaktivitäten bei längerer Einsatzzeit ein limitierender Faktor sind. (Wyman and Hinman 1990, Larsson, Palmqvist et al. 1999, Chang and Holtzaple 2000, Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000)

Ein weiteres Problem in der Nutzung der NaWaRos besteht darin, dass es eine Vielzahl von verschiedenen Zusammensetzungen innerhalb der NaWaRos gibt. So wird nicht nur unter Weich- und Harthölzern, diversen landwirtschaftlichen Pflanzen und Gräsern unterschieden, sondern auch zwischen unterschiedlichen Typen einer Gattung. Daher muss für jeden Ausgangsstoff ein eigener Prozess entwickelt werden, um einen effizienten Aufschluss zu gewährleisten.

Um zu klären, welche Ressourcen für eine nachhaltige Nutzung verfügbar sind, hat die Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe (FNR) e.V. den Status quo für Biomassenpotentiale von Rest- und Abfallstoffen im Jahr 2015 bestimmt. In Deutschland stehen 151 Mio. Tonnen Trockenmasse pro Jahr für die stoffliche und thermische Nutzung zur Verfügung. Dabei dominieren die holz- und forstwirtschaftlichen Reststoffe mit 43 % und die Nebenprodukte aus der Landwirtschaft mit 30 %. Die restlichen Anteile verteilen sich auf u.a. Siedlungsabfälle und industrielle Reststoffe. (Brosowski, Adler et al. 2015) Ein Großteil dieser Rest- und Rohstoffe wird bereits für die thermische Energiegewinnung genutzt (Perlack, Wright et al. 2005, Brosowski, Adler et al. 2015).

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist es, eine effektive Vorbehandlung und Hydrolyse für die stoffliche Biomassennutzung zu entwickeln, bei der keine fraktionierenden Vorbehandlungsschritte anzuwenden sind. Dafür muss zunächst eine geeignete Biomasse identifiziert werden, die für die stoffliche Nutzung geeignet ist. Dazu müssen verschiedene, nachwachsende Roh- und Reststoffe charakterisiert werden, die jährlich in großen Mengen zur Verfügung stehen. Die geeignete Biomasse sollte einen hohen Kohlenhydratanteil aufweisen und nicht in Konkurrenz zur Lebens- und Futtermittelproduktion stehen - am geeignetsten dafür sind, laut FNR, agrarische Reststoffe wie Kaff aufgrund des ungenutzten Vorhandenseins.

Sofern ein geeigneter Rohstoff identifiziert ist, müssen geeignete Vorbehandlungsmethoden entwickelt und untersucht werden. Zu den Methoden zählen mechanische und thermochemische Vorbehandlungen, die hinsichtlich der einflussreichsten Parameter wie, Temperatur, Zeit und Konzentration optimiert werden müssen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Struktur der Lignocellulose so verändert wird, dass eine enzymatische Hydrolyse mit hohen Zuckerausbeuten möglich ist. Bei der Vorbehandlung von Biomasse können Degradationsprodukte (Zuckerabbauprodukte (u.a. Formiat, Hydroxymethylfurfural (HMF), Furfural), Acetat und Phenole) entstehen, die die anschließende Hydrolyse und folgende Fermentation inhibieren können. (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Kumar and Wyman 2009, Álvarez, Reyes-Sosa et al. 2016) Diese Nebenprodukte müssen durch die Wahl einer geeigneten und optimierten Vorbehandlung minimiert werden, um kostenintensive Down-Stream Prozesse zu vermeiden.

Im Anschluss an die Vorbehandlung erfolgt die enzymatische Hydrolyse. Um eine effiziente Verzuckerung für die gewählte Biomasse zu etablieren, müssen die Prozessbedingungen, wie Dauer der enzymatischen Hydrolyse, Feststoffgehalt, Vermischungssysteme und die Menge des eingesetzten Enzyms optimiert werden. Eine effiziente Hydrolyse zeichnet sich dabei durch einen hohen Verzuckerungsgrad, einen geringen Enzymeinsatz und hohe Zuckerendkonzentration aus, da dies die kostenbestimmenden Parameter der Hydrolyse sind.

3. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1. NACHWACHSENDE, AGRARISCHE ROH- UND RESTSTOFFE

Agrarische, nachwachsende Roh- bzw. Reststoffe wie Stroh und Kaff (Sprenu) bestehen aus Lignocellulose, dessen Hauptbestandteile Cellulose, Hemicellulose und Lignin sind. Abhängig vom Rohstoff können auch Öle, Proteine, Stärke, Pektin, und Mineralien enthalten sein. (Wyman 1996, Kamm, Gruber et al. 2006, Balat 2011, Ximenes, Kim et al. 2013) Die komplexe Struktur der Lignocellulose ist in Abbildung 3-1 abgebildet.

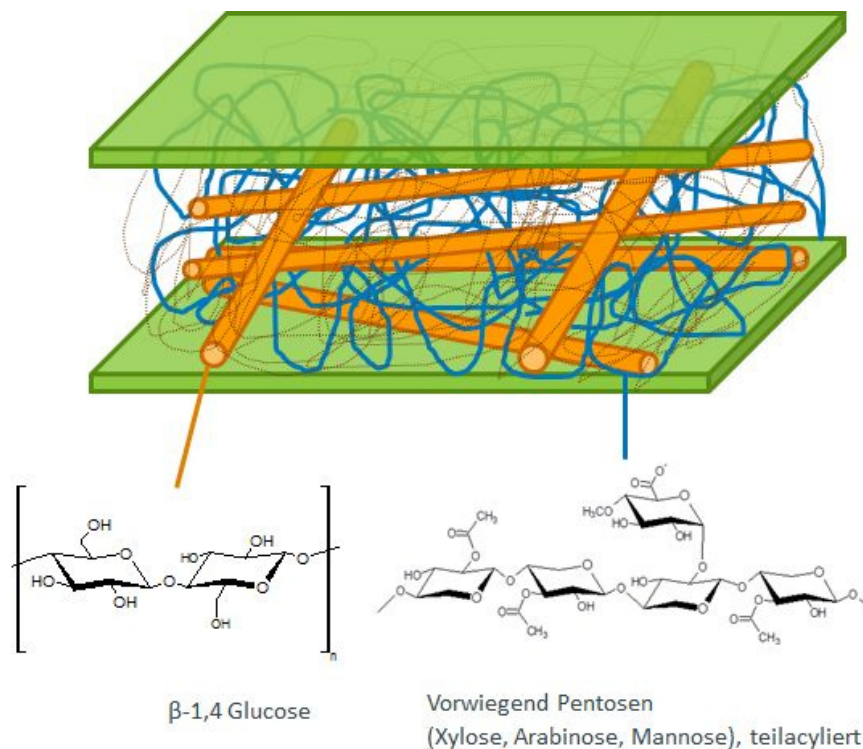


ABBILDUNG 3-1 PFLANZENZELLWANDAUFBAU DER LIGNOCELLULOSE: ABGEBILDET SIND DIE HAUPTKOMPONENTEN **CELLULOSE**, **HEMICELLULOSE** UND **LIGNIN**. ABBILDUNG VERÄNDERT NACH (MOSIER, WYMAN ET AL. 2005, DAVISON, PARKS ET AL. 2013, PHITSUWAN, SAKKA ET AL. 2013, XIMENES, KIM ET AL. 2013)

Durch die verflochtene Anordnung und Verbindung der einzelnen Komponenten erhält die Pflanzenwand eine sehr große mechanische Stabilität und eine große Zugfestigkeit. Dabei liegen zwischen dem Lignin und der Hemicellulose kovalente Bindungen und zwischen der Hemicellulose und der Cellulose Wasserstoff-Brückenbindungen vor. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Bestandteile variiert dabei innerhalb von Pflanzengattungen und Typen. Durch die Stabilität der Lignocellulose ist sie vor äußeren Einflüssen gut geschützt und ein Abbau der Einzelkomponenten ist nur durch ein Aufbrechen der Struktur möglich.

3.1.1. CELLULOSE

Cellulose ist ein weißes, kristallines, Pflanzenzellwandpolysaccharid, das aus β -1,4-glykosidisch-verknüpften Glucosemolekülen (Abbildung 3-2) besteht. Zwei verknüpfte Glucoseeinheiten bilden dabei eine Cellobioseeinheit. Es bildet dabei die Gerüstsubstanz der Zellwand. Die Anhydroglucoseeinheiten sind alternierend um 180° versetzt, wodurch eine lineare Anordnung möglich ist. (Wyman and Hinman 1990, Belitz, Grosch et al. 2008)

Durch diese lineare Anordnung werden Cellulosefibrillen gebildet, die in den Pflanzen für Zugfestigkeit und Schutz vor äußeren Einflüssen sorgen und somit Stabilität geben. (Wyman and Hinman 1990, Klemm, Heublein et al. 2005, Wyman 2013, Bali, Meng et al. 2015) Der Celluloseanteil variiert in den Rohstoffquellen zwischen 25-39 % in Holz und 10-53 % in anderen landwirtschaftlichen Lingnocellulosen. (Sun and Cheng 2002, Kumar, Gautam et al. 2016).

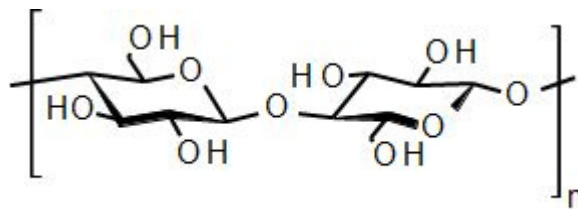


ABBILDUNG 3-2 CELLULOSEAUFBAU: BESTEHEND AUS CELLOBIOSE-EINHEITEN, MIT β -1,4 VERKNÜPFTER GLUCOSE, VERÄNDERT NACH (BELITZ, GROSCH ET AL. 2008)

Der Polymerisationsgrad variiert je nach Herkunft zwischen 1000 bis 14000, wodurch Cellulose in Wasser unlöslich ist. Durch den hohen Polymerisationsgrad liegen innerhalb der Cellulosefibrillen im Durchschnitt 60 % der Cellulose als kristalline Bereiche und 40 % als amorphe Bereiche vor, was ein Aufquellen und eine Hydrolyse erschwert. (Belitz, Grosch et al. 2008, Kumar, Mago et al. 2009) Das Vorkommen an amorphen und kristallinen Teilen der Cellulose beeinflusst auch die säurekatalysierte Hydrolyse, da die aus den amorphen Teilen gewonnenen Monosaccharide bereits zu Degradationsprodukten abgebaut werden, bevor die kristallinen Teilbereiche vollständig hydrolysiert werden können. Auch die enzymatische Hydrolyse von Cellulose hängt stark von der Kristallinität ab. So können die kristallinen Bereiche nur schwer enzymatisch aufgeschlossen werden. (Fan, Gharpuray et al. 1987, Hendriks and Zeeman 2009, Álvarez, Reyes-Sosa et al. 2016)

3.1.2. HEMICELLULOSE

Unter dem Begriff Hemicellulose werden verschiedene Kohlenhydrate zusammengefasst, die die Räume zwischen den Cellulosefibrillen und dem Lignin innerhalb der Pflanzenzellwände ausfüllen. (Belitz, Grosch, & Schieberle) Eine mögliche Struktur mit dem Hauptbestandteil Xylan ist in Abbildung 3-3 abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass die Hemicellulose teilacetyliert ist. Dies ist die Ursache, weshalb nach der Hydrolyse von Hemicellulose immer Acetatgruppen vorliegen. Dies ist bei der Beurteilung der gebildeten Abbauprodukte zu berücksichtigen. Der Hemicellulose-Anteil variiert dabei von 24-40 % bei Holz und 3-21 % bei landwirtschaftlichen Reststoffen (Fan, Gharpuray et al. 1987, Wyman 1996, Wyman 2013, Kumar, Gautam et al. 2016)

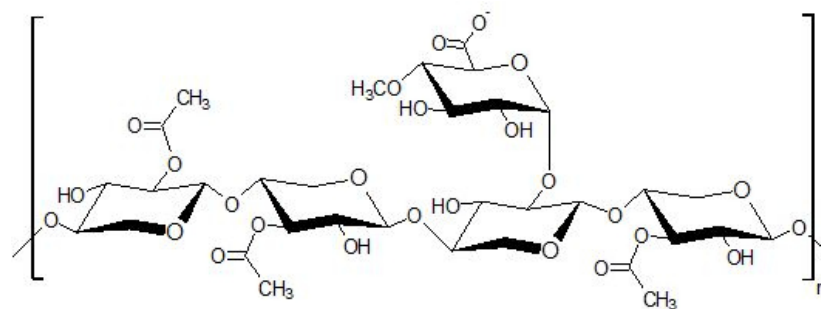


ABBILDUNG 3-3 MÖGLICHER HEMICELLULOSEAUFBAU AUS XYLAN, TEILACETYLIERT, VERÄNDERT NACH (WANG 2007, WYMAN 2013)

Hemicellulose ist im Vergleich zur Cellulose leicht hydrolysierbar, da das verzweigte Makromolekül amorph und somit leicht für Enzyme und Säure zugänglich ist. Die nach der Hydrolyse auftretenden Kohlenhydrate bestehen hauptsächlich aus C₅ Zuckern (Xylose und Arabinose) und einem Teil C₆ Zuckern (Galactose, Glucose, Mannose), deren Zusammensetzung zwischen verschiedener Rohstoffquellen variiert. Die möglichen Monosaccharide sind in Abbildung 3-4 abgebildet. (Wyman and Hinman 1990, Saha, Iten et al. 2005, Saha and Cotta 2010, Eisenhuber, Krennhuber et al. 2013, Wyman 2013, Gao, Kumar et al. 2014, Sella Kapu and Trajano 2014)

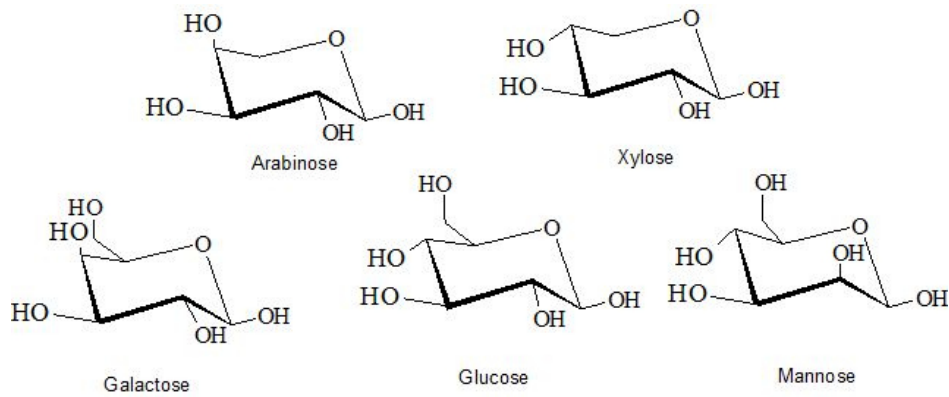


ABBILDUNG 3-4 MÖGLICHE KOHLENHYDRATMONOMERE NACH HYDROLYSE VON HEMICELLULOSE

3.1.3. LIGNIN

Lignin ist ein amorphes, leicht bräunliches, heterogenes Polymer, dass für die Druckfestigkeit der Zellwand zuständig ist. Je nach Biomasse variiert der Ligninanteil von 20–35 % bei Holz und bei landwirtschaftlichen Lignocellulosen zwischen 9–32 %. (Ralph, Lundquist et al. 2004, Kumar, Gautam et al. 2016). Das Lignin wirkt zudem als Schutz vor dem Eindringen von Mikroorganismen und Wasser in die Pflanze, wodurch ein Abbau der Lignocellulose verhindert wird. Die Heterogenität der Matrix ist u.a. dafür verantwortlich, dass die Struktur schlecht aufzubrechen ist. In Abbildung 3-5 ist die Ligninstruktur nach (Adler 1977) abgebildet. (Nimz 1974, Hirschberg 1999, Ralph, Lundquist et al. 2004, Yang and Wyman 2008, Hu, Jung et al. 2012, Li, Pu et al. 2013, Wyman 2013) Diese zeigt allerdings nur eine, von vielen möglichen Varianten des Lignins, das durch die Heterogenität und durch die vielfältige Kombination der Hauptbestandteile Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkhol erklärt werden kann. Derzeit wird Lignin hauptsächlich für die thermische Verwertung genutzt, da die einzelnen Phenolkomponenten nicht isoliert und somit nicht selektiv genutzt werden können. Ist dies in großem Maßstab möglich, bietet Lignin vielfältige Einsatzmöglichkeiten. (McCarthy and Islam 1999, Ralph, Lundquist et al. 2004, Mussatto and Teixeira 2010, Hu, Jung et al. 2012, Zhao, Zhang et al. 2012)

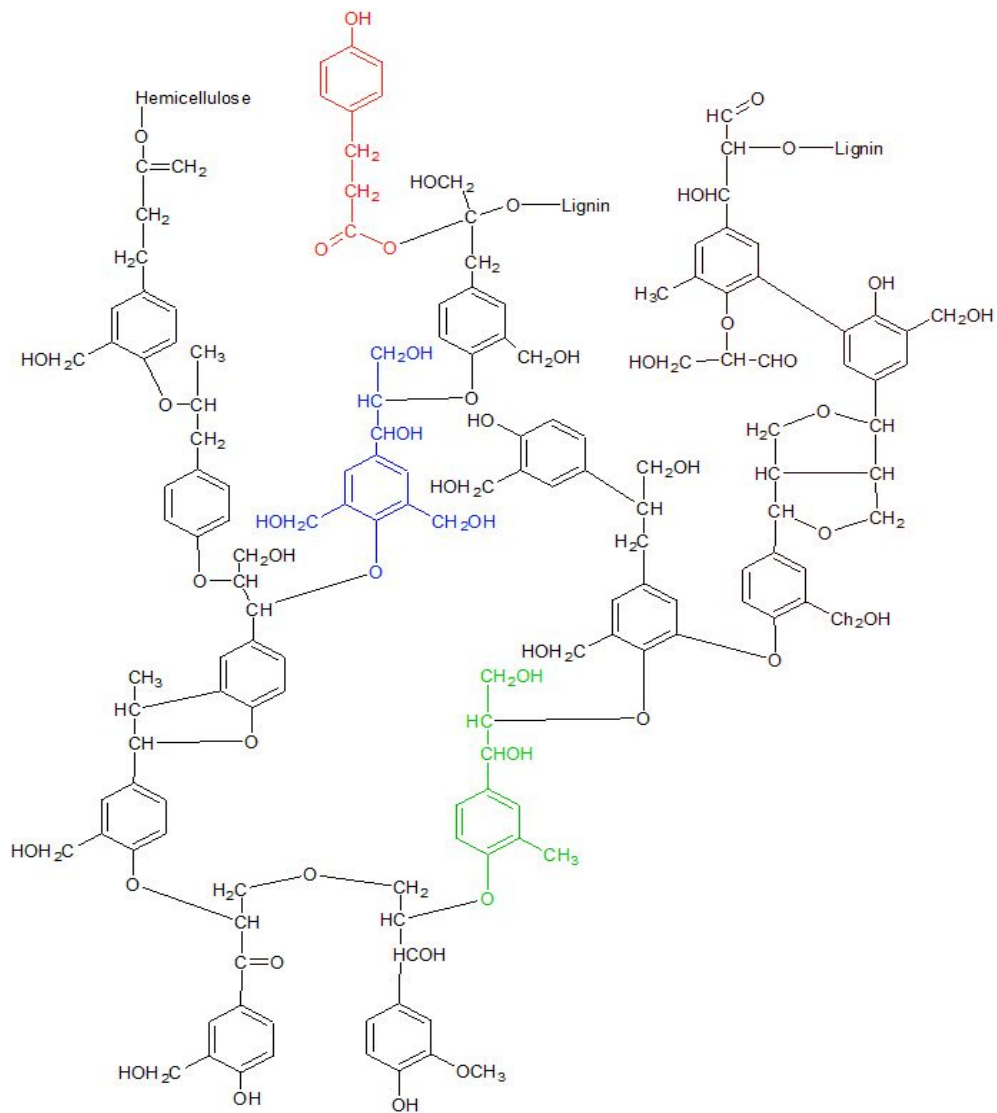


ABBILDUNG 3-5 LIGNINSTURKTUR MIT CUMARYL-, SINAPYL- UND CONIFERYLEINHEITEN ALS HAUPTKOMPONENTEN, DIE ÜBER ESTER- UND ETHERBRÜCKEN IN DAS LIGNINNETZWERK EINGEBUNDEN SIND, VERÄNDERT NACH (ADLER 1977, RALPH, LUNDQUIST ET AL. 2004)

3.2. VORBEHANDLUNGEN

Aufgrund der strukturellen Widerstandsfähigkeit der Lignocellulose gegenüber der enzymatischen Hydrolyse, muss die Lignocellulose-Struktur zerstört werden, um die Cellulose und die Hemicellulose für eine effiziente und kostengünstige Hydrolyse zugänglich zu machen. In Abbildung 3-6 ist das Funktionsprinzip einer Vorbehandlung abgebildet.

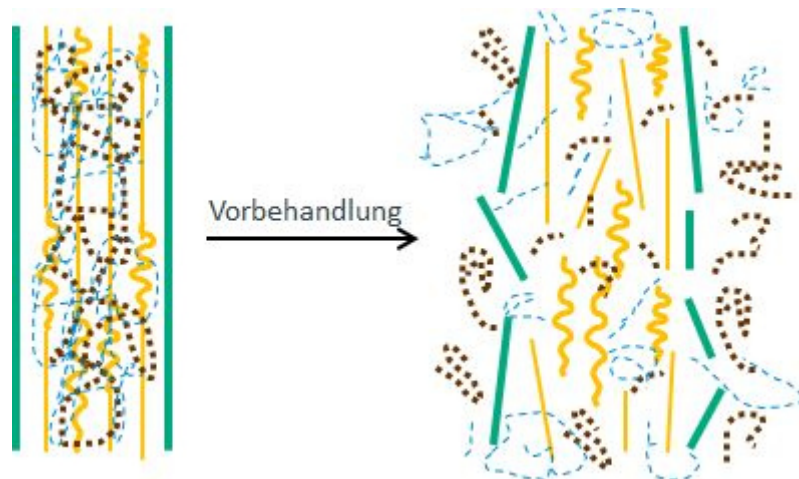


ABBILDUNG 3-6 FUNKTIONSPRINZIP DER VORBEHANDLUNG VON BIOMASSE, ABGEBILDET SIND DIE HAUPTKOMPONENTEN CELLULOSE, HEMICELLULOSE, LIGNIN, UND DIE PFLANZENZELLWAND, VERÄNDERT NACH (KUMAR, MAGO ET AL. 2009)

Dabei kann die Vorbehandlung physikalisch/mechanisch (Vermahlung, Fraktionieren, Waschen), thermochemisch (Temperatur, Lösemittel, Katalysatoren) oder mikrobiell erfolgen. In der Regel werden für einen effizienten Prozess mehrere Verfahren kombiniert. Die mikrobiologische Vorbehandlung wird industriell nicht verwendet, da sie einen sehr langen Zeitraum erfordert und die verwendeten Pilze den zur Verfügung stehenden Zucker bereits z.T. verwerten, was die maximale Zuckerkonzentration minimiert. (Wyman 2013) Daher ist diese Vorbehandlung keine Option für die vorliegende Arbeit.

3.2.1. PHYSIKALISCH/MECHANISCH

Das Vermahlen von Biomasse ist der erste Schritt der Vorbehandlung, um die Oberfläche der Biomasse und somit die Reaktionsfläche in den Folgeschritten zu vergrößern. Die Zerkleinerung kann dabei mittels Druck-, Prall-, Schneid-, Scher- oder

Reibkraft erfolgen. Bekannte Vertreter dieser Mühlen sind die Messermühle (Schneidkraft), Hammermühle (Prall-, Scherkraft) und die Kugelmühle (Druck-, Prall-, Scherkraft). Dabei ist zu beachten, dass der Mahlvorgang sehr energieaufwändig ist und somit ein Kompromiss aus Partikelgröße und Energiekosten gefunden werden muss. (Millett, Effland et al. 1979, Holtzapfle, Humphrey et al. 1989, Yang and Wyman 2008, Wyman 2013, Tumuluru, Tabil et al. 2014)

3.2.2. CHEMISCH/THERMOCHEMISCH

Die chemische Vorbehandlung umfasst die Behandlung mit Säuren, Basen, Lösungsmitteln und ggf. Temperatur. Je nach (thermo-) chemischer Vorbehandlung wird die Biomasse aufgespalten oder fraktioniert. Durch die verschiedenen Eigenschaften kann zwischen sauren, neutralen oder basischen Vorbehandlungen unterschieden werden. In allen Vorbehandlungen können verschiedene Degradationsprodukte entstehen (siehe Abbildung 3-7).

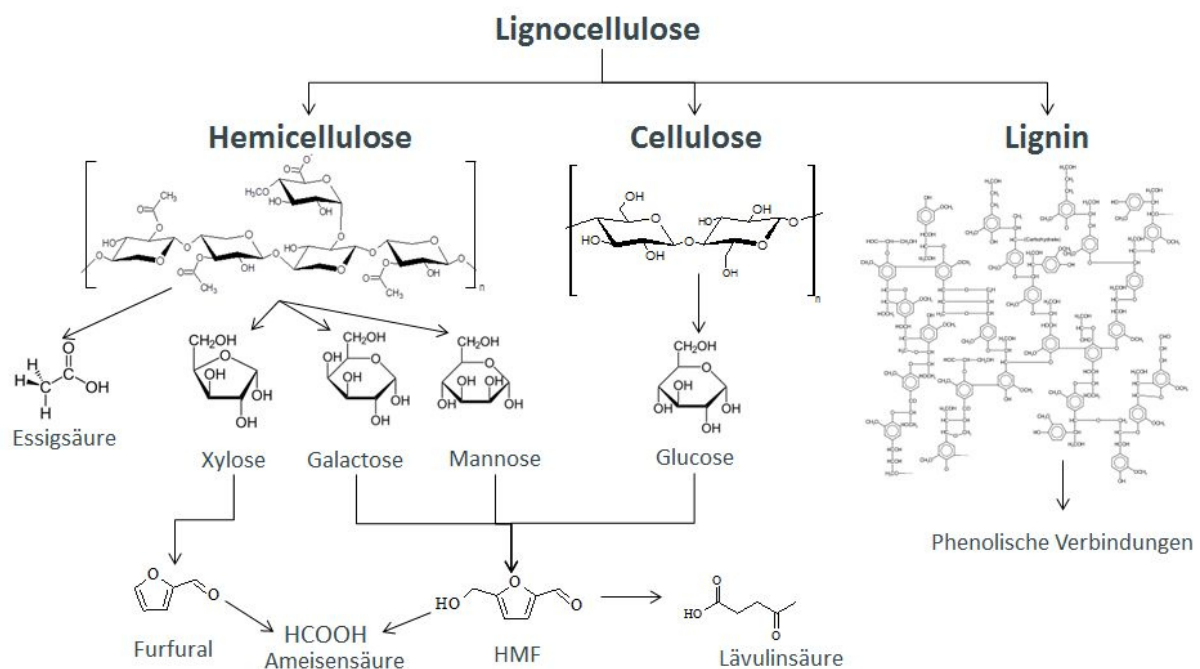


ABBILDUNG 3-7 ENTSTEHUNG VON DEGRADATIONSPRODUKTEN DURCH DIE VORBEHANDLUNG AUS LIGNOCELLULOSE, VERÄNDERT NACH (PALMQVIST AND HAHN-HÄGERDAL 2000)

Die durch die Vorbehandlung vorliegenden Zuckermomere können zu Hydroxymethylfurfural (HMF) und Furfural weiterreagieren. Diese können weiter zu

Ameisensäure oder Lävulinsäure zersetzt werden. Aus dem Lignin kann eine Vielzahl von verschiedenen phenolischen Verbindungen entstehen. Die Bildung von Essigsäure bzw. Acetat kann nicht verhindert werden, da wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, die Hemicellulose teilacetyliert ist. Die gebildeten Abbauprodukte müssen vermieden werden, da sie die Folgeprozesse (Hydrolyse und Fermentation) inhibieren können. (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Klinker, Thomsen et al. 2004, Saini, Patel et al. 2016)

3.2.2.1. SÄUREKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG

Die säurekatalysierte Lignocellulose-Vorbehandlung für Holz ist seit 1856 bekannt und wurde bereits für viele verschiedene Säuren untersucht. (Wenzl Hermann 1954, Lloyd and Wyman 2005, Chen, Zhao et al. 2009, Guragain, De Coninck et al. 2011) Dabei wird zwischen verdünnter und konzentrierter Säure-Vorbehandlung unterschieden. Mit einer konzentrierten Säure Vorbehandlung findet jedoch eine Vollhydrolyse statt, sodass für enzymatische Hydrolysen nur verdünnte Säuren zum Einsatz kommen. Die typischen Reaktionsbedingungen liegen dabei zwischen 150-220°C, einer Reaktionsdauer von einigen Minuten bis zu Stunden und Säurekonzentrationen zwischen 0,5 und 5 %. Die am häufigsten verwendeten Säuren sind Salz- und Schwefelsäure. (Wyman 1996, Yang and Wyman 2004, Chen, Sharma-Shivappa et al. 2007, Kumar, Barrett et al. 2009, Kumar and Wyman 2009, Harmsen, Huijgen et al. 2010, Trajano and Wyman 2013) Das Funktionsprinzip dieser Vorbehandlung liegt in der Hydrolyse der Hemicellulose (die bis zu 90 % verzuckert wird), wodurch die Cellulose frei vorliegt und anschließend durch Enzyme hydrolysiert werden kann. Durch den hohen Anteil an Zuckermonomeren in der sauren Reaktionslösung, kann eine vermehrte Bildung von Degradationsprodukten (wie HMF, Furfural und org. Säuren) entstehen, wie sie in Abbildung 3-7 abgebildet sind. (Saha, Iten et al. 2005, Canilha, Carvalho et al. 2006, Yang and Wyman 2008, Yang, Li et al. 2010, Chandel, Antunes et al. 2012, Trajano and Wyman 2013, Zhang, Tong et al. 2014)

3.2.2.2. pH-NEUTRALE VORBEHANDLUNG

Die pH-neutrale Vorbehandlung umfasst die lösungsmittelbasierte und wasserbasierte Vorbehandlung. Ziel der Vorbehandlung ist es, einen oder mehrere Komponenten der Lignocellulose in Lösung zu bringen, um sie zu fraktionieren und nach der Separation hydrolysieren zu können. Für diese Zwecke werden u.a. ionische Flüssigkeiten verwendet, da sie hervorragende Lösungseigenschaften gegenüber einzelner Komponenten aufweisen. Der große Nachteil der ionischen Flüssigkeiten liegt aber in den sehr hohen Kosten der Lösungsmittel und der schlechten Abtrennungsmöglichkeiten der Zucker aus der Flüssigkeit. (Fu, Mazza et al. 2010, Brandt, Ray et al. 2011, Engel, Krull et al. 2012, Singh and Simmons 2013, Elgharbawy, Alam et al. 2016) Daher finden Ionische Flüssigkeiten in der Industrie keine Verwendung und werden deshalb in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

Eine weitere, weit verbreitete Technik ist das sogenannte Organo-Solv-Verfahren. Durch ein Wasser/Ethanol-Gemisch werden Lignin und Hemicellulose unter hohen Temperaturen in Lösung gebracht und es bleibt eine Cellulose angereicherte Fraktion zurück, die hydrolysiert werden kann. (Sannigrahi and Ragauskas 2013, Anders 2014, Jang, Kim et al. 2016, Mabrouk, Erdocia et al. 2016, Shui, Feng et al. 2016) Da Anders (2014) die ethanolische Fraktionierung mit anschließender Hydrolyse bereits für agrarische Rohstoffe, insbesondere Weizenkaff, untersucht hat, wird auch diese Technik nicht weiter in der Arbeit behandelt.

Eine weitere pH-neutrale Vorbehandlung ist „Liquid Hot Water“ (LHW), indem die Proben nur mit Wasser in einem Hochdruck/Temperatur Reaktor erhitzt werden, wodurch die Hemicellulose gelöst und hydrolysiert wird. Dadurch ist ein späterer, enzymatischer Abbau der Cellulose möglich. Der Vorteil dieser Vorbehandlung liegt darin, dass keine weiteren Katalysatoren eingesetzt werden und diese nicht durch kostenintensive Schritte wieder entfernt werden müssen. Um das LHW-Verfahren nutzen zu können, werden hohe Temperaturen (in der Regel >200 °C) benötigt. Die dabei in Lösung gebrachten Acetatgruppen der Hemicellulose werden dabei zu Essigsäure und in Kombination mit der Autoprotolyse des Wassers bei den hohen Temperaturen entsteht ein saures Milieu. Durch diese Reaktionsbedingungen können Degradationsprodukte wie bei der säurekatalysierten Vorbehandlung (siehe 3.2.2.1) entstehen. (Walsum, Allen et al. 1996, Mosier, Hendrickson et al. 2005, Yu, Zhuang et al. 2010, Kim, Kreke et al. 2013)

3.2.2.3. BASENKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG

Die basische Vorbehandlung hat das Ziel, die Biomasse so vorzubehandeln, dass die Lignin-Hemicellulose Verbindungen aufgebrochen werden, das Lignin somit in Lösung gebracht werden kann und die Cellulose durch die hohe Ionenstärke der Reaktionslösung aufquillt. Dabei werden die kristallinen Bereiche der Cellulose so verändert, dass eine enzymatische Hydrolyse vereinfacht wird. Des Weiteren wird u.a. von Chang und Holtzapfle (Chang and Holtzapfle 2000) beschrieben, dass die Acetylgruppen der Hemicellulose abgespalten und in Lösung gebracht werden. So können diese, falls notwendig, für eine spätere Fermentation einfach abgetrennt werden. Typische Basen, die für die Vorbehandlungen genutzt werden, sind Natronlauge (NaOH), Ammoniak und Kalziumhydroxid. Die basischen Vorbehandlungen haben den Vorteil, dass sie im Vergleich zu den säurekatalysierten Vorbehandlungen milde Reaktionsbedingungen benötigen wodurch Degradationsprodukte deutlich reduziert werden können. In der Literatur werden als typische Reaktionsbedingungen Temperaturen zwischen 50-140 °C, Konzentrationen zwischen 0,1-10 % und Zeiten von 30 min-24 h (Chang and Holtzapfle 2000, Kim, Kim et al. 2003, Cheng, Zheng et al. 2010, Kim, Kreke et al. 2013, Ramirez, Holtzapfle et al. 2013, Li, Merrettig-Bruns et al. 2014, Wang, Wang et al. 2016, Yu, Li et al. 2016)

3.3. HYDROLYSE

Die Hydrolyse von Hemicellulose und Cellulose kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die mechanische (durch Vermahlen) sowie alkalische Hydrolyse sind dabei aufgrund der hohen Kosten und geringen Ausbeuten technisch nicht relevant, aber prinzipiell möglich. (Sequeira, Casanova et al. 2006, Yang and Wyman 2008)

Die säurekatalysierte Hydrolyse wurde bereits im großtechnischen Maßstab in den Jahren 1934-1959 im Scholler-Prozess sowie 1931-1949 im Bergius-Rheinau-Prozess für die Holzhydrolyse genutzt. Dabei erfolgt die Spaltung der glykosidischen β -1,4 Bindung der Cellulose im ersten Schritt durch eine Protonierung des glykosidischen Sauerstoffatoms, was zu einer Bindungsspaltung und zu einer Carbokationbildung führt. An dieser Stelle lagert sich ein Wassermolekül an, dass durch Abspaltung eines Protons zur Hydroxylgruppe des Kohlenhydrates wird. Dieser Mechanismus der säurekatalysierten Hydrolyse ist in Abbildung 3-8 abgebildet. Nach der Hydrolyse zu

Glucose, kann diese unter hohen Temperaturen durch Enolisierung und Dehydrationsreaktionen zu HMF oder anderen Pyranverbindungen und letztendlich zu Lävulinsäure oder Ameisensäure umgesetzt werden. (Scholler 1937, Kollmann 1951, Wenzl Hermann 1954, Specht 1955, Nevell and Upton 1976, Belitz, Grosch et al. 2008)

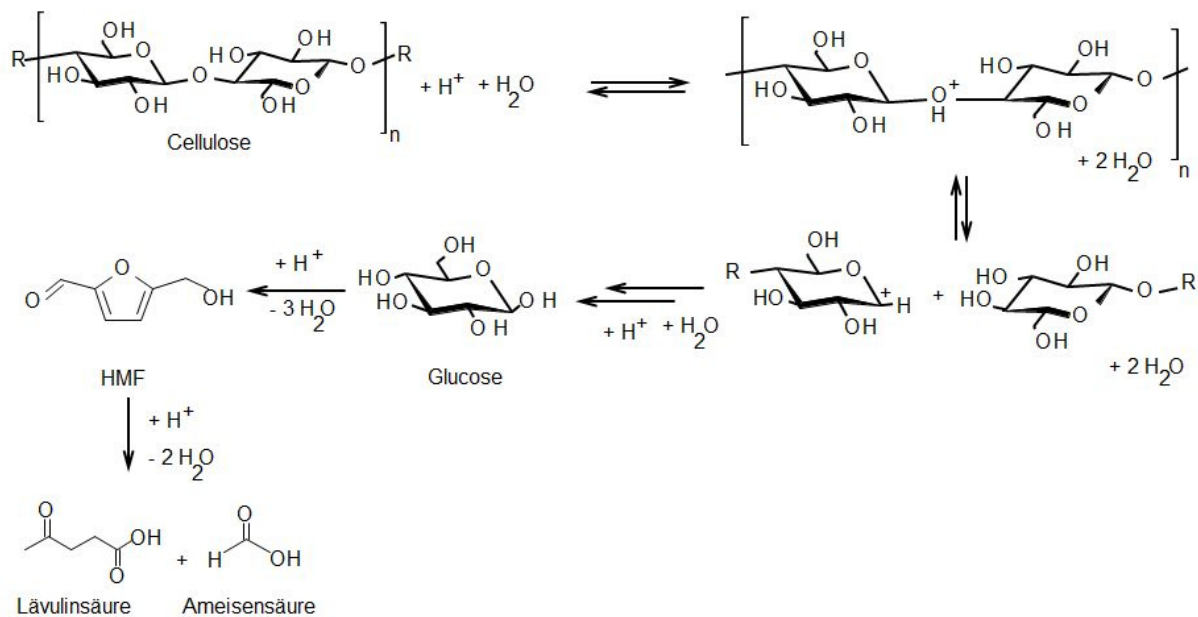


ABBILDUNG 3-8 MECHANISMUS DER SÄUREKATALYSIERTEN HYDROLYSE NACH (NEVELL AND UPTON 1976, BELITZ, GROSCH ET AL. 2008)

Da die sauerkatalysierte Hydrolyse immer Degradationsprodukte generiert und das Ziel dieser Arbeit ein degradationsproduktfreies Hydrolysat ist, wird diese Hydrolyse nicht in Betracht gezogen.

Für die Hydrolyse der vorbehandelten Biomassen wird die enzymatische Hydrolyse gewählt. Die enzymatische Spaltung der Kohlenhydrate erfordert mehrere Enzymaktivitäten, da jedes Enzym selektiv arbeitet und nur spezifische Bindungen spalten kann. Der Hauptbestandteil der Lignocellulose ist die Cellulose. Um diese zu spalten, werden Cellulasen benötigt. Die Gruppe der Cellulasen lässt sich in drei Aktivitäten einteilen. Die Exo- β -1,4-Glucanasen oder auch Cellobiohydrolasen genannt, spalten Cellobioseeinheiten (zwei β -1,4-glykosidisch verknüpfte Glukoseeinheiten) am Kettenende ab. Dabei können sie am amorphen und kristallinen Bereich aktiv sein, wobei der Abbau kristalliner Cellulose langsamer ist als der der amorphen Cellulose. Des Weiteren liegen in Cellulasen die Endo- β -1,4-Glucanasen vor, die in amorphen Bereichen die Ketten spalten können und so neue Kettenenden für

die Exo-Glucanasen generieren. Die dritte Enzymaktivität ist die β -Glucosidase, die die β -1,4-glykosidisch Verknüpfung der Cellobiose spaltet und so Glucosemonomere generiert. (Walker and Wilson 1991, Medie, Davies et al. 2012, Barcelos, Rocha et al. 2015) Da die Cellulose die Hauptkomponente der Lignocellulose ist, ist der vereinfachte Cellulose-Hydrolysemechanismus exemplarisch in Abbildung 3-9 dargestellt.

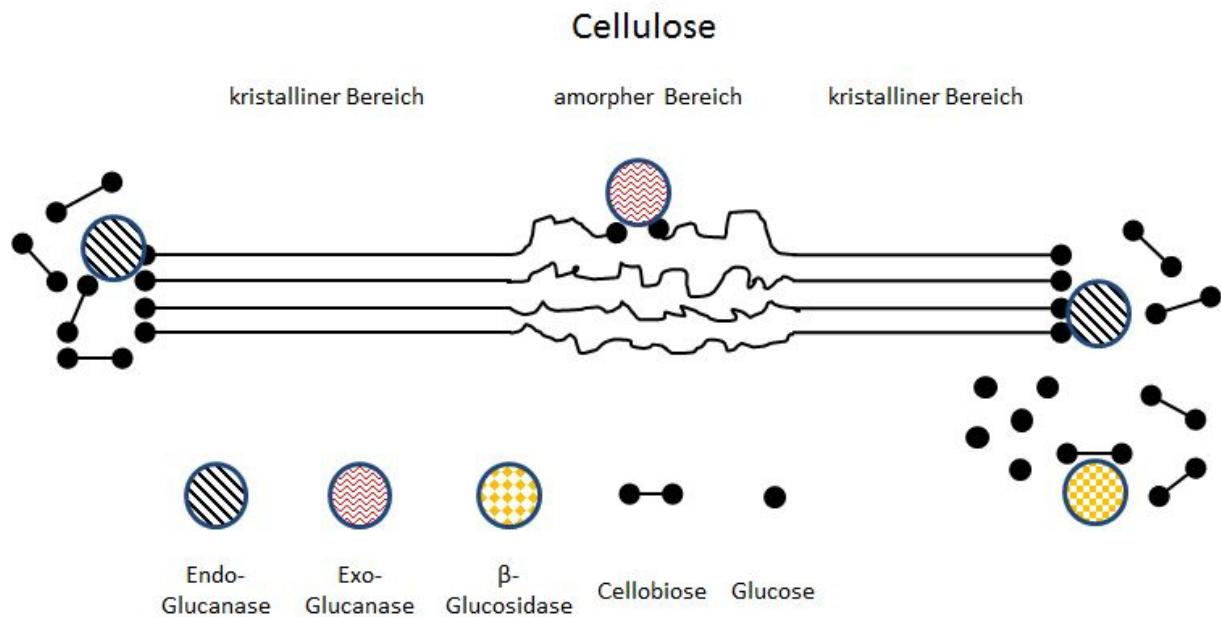


ABBILDUNG 3-9 SCHEMA DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE VON AMORPHER UND KRISTALLINER CELLULOSE VERÄNDERT NACH (MEDIE, DAVIES ET AL. 2012, QUIROZ-CASTAÑEDA AND FOLCH-MALLOL 2013, BARCELOS, ROCHA ET AL. 2015)

Für die Hemicellulose werden weitere Enzymaktivitäten benötigt. So werden für die Xylane der Hemicellulose Xylanasen und für den Arabinoseabbau Arabinasen benötigt. Um das Lignin zu depolymerisieren, können Laccasen eingesetzt werden, da sie die Oxidation phenolischer Substanzen katalysieren.

3.4. ROHSTOFFE: KAFF UND STROH

Da in dieser Arbeit insbesondere auf Kaff und Stroh eingegangen wird, muss auf diese beiden Rohstoffquellen im Vorfeld näher eingegangen werden.

Kaff, oder auch Spreu genannt, besteht aus den beim Dreschen abfallenden Spelzen, Hülsen und Grannen siehe ABBILDUNG 3-10 WEIZENKAFF (BESTEHEND AUS SPELZEN, HÜLSEN UND GRANNEN



ABBILDUNG 3-10 WEIZENKAFF (BESTEHEND AUS SPELZEN, HÜLSEN UND GRANNEN) UND STROHRESTE

Kaff wird derzeit nicht geerntet und verbleibt auf dem Feld, was im Falle eines Pilzbefalles (durch z.B. *Fusarien*) einen negativen Einfluss durch Kontamination auf die Folgeernten haben kann. Der Kaffanteil eines Weizenhalms liegt zwischen 15-20 wt.% (Craig, Coxworth et al. 1987, Bledzki, Mamun et al. 2010). Im Jahr 2009 wurden weltweit $682 \cdot 10^6$ t Weizen produziert, was zu einem weltweiten Kaffpotential von $124 \cdot 10^6$ t führt und aufzeigt, dass dieser Rohstoff weltweit in großen Maßen verfügbar ist. (Bledzki, Mamun et al. 2010) In Deutschland fallen jährlich zwischen 7–10 mio Tonnen Kaff bei einer genutzten Ackerfläche von $3,2 \cdot 10^6$ ha für Weizen an. (Craig, Coxworth et al. 1987, Beneke and Rumpler 2013, Rumpler 2014, Destatis 2017)

Der Nachteil in der Nutzung von Kaff liegt darin, dass erst neue Erntetechniken implementiert werden müssen, um Kaff nutzen zu können. In den Vorkriegsjahren wurde Kaff in Deutschland bereits als Futtermittel genutzt und von Herstellern wie CLAAS gab es bereits Erntemaschinen. Doch in den Nachkriegsjahren geriet diese Ressource durch die große Verfügbarkeit von anderen Futtermitteln wieder in Vergessenheit. Weltweit wird nun nach neuen Ansätzen gesucht, um Kaff bei der Ernte mit zu ernten und so für eine nachhaltige Nutzung zur Verfügung stellen zu können. (McCartney, Block et al. 2006, Marti, Berger et al. 2012, Rumpler 2014)

Das Strohpotential für Deutschland liegt im Vergleich zu Kaff bei $\sim 30 \cdot 10^6$ t pro Jahr. Somit ist knapp die 3-fache Menge pro Jahr an Stroh verfügbar. Diese Mengen sind

jedoch nicht frei verfügbar, da Stroh im Gegensatz zu Kaff bereits in vielen unterschiedlichen Prozessen genutzt wird. Ein Großteil des Strohs (~30 %) muss zur Humusreproduktion auf dem Feld verbleiben, ca. 17 % finden als Einstreu in der Viehhaltung Verwendung und zusätzlich gibt es bereits einige Prozesse und Anlagen zur energetischen Nutzung von Stroh. Weitere Prozesse wie die Verwendung von Stroh in Kunststoff-Verbundwerkstoffen, in der Dämmstoffproduktion, in der Produktion von Aromastoffen oder bei der Erdbeer- und Champignonzucht spielen dabei keine signifikante Rolle, verdeutlichen aber den breiten Einsatzort von Stroh. (Zeller, Thrän et al. 2012)

4. MATERIAL & METHODEN

4.1. ROHSTOFFCHARAKTERISIERUNG

Die Rohstoffcharakterisierung erfolgte nach validierten Methoden der NREL (National Renewable Energy Laboratory). Die benutzten Einzelmethode für die Bestimmung des Zuckeranteils, des säureunlöslichen Rückstandes, des Wasser-, Stickstoff- und Aschegehaltes werden in den Punkten 4.1.1 - 4.1.5 genauer beschrieben.

4.1.1. WASSERGEHALT

Die Bestimmung des Wassergehaltes wurde durch den Gewichtsverlust bei 105 °C nach 24 h bestimmt [Sluiter 2008: total solids]. Dazu wurde 5 g Probe in einem Porzellan-Tiegel eingewogen und für 24 h bei 105 °C im Trockenschrank (Heraeus Instruments, Hanau, Ger) getrocknet. Nach Auskühlen im Exikator wurde die Probe erneut gewogen und die Differenz wurde als prozentualer Gewichtsverlust bestimmt. Die Trockenmasse wurde für alle folgenden Versuche berücksichtigt.

4.1.2. ZUCKERGEHALT

Die Bestimmung des Zuckergehaltes der verschiedenen Biomassen erfolgte mittels zweistufiger Säurehydrolyse - NREL Vorschrift nach Sluiter et al. (2006) (Sluiter, Hames et al. 2006). Dazu wurden 0,3 g Biomasse in einem 50 mL Falcon-Tube eingewogen und mit 3 mL 72 %iger Schwefelsäure (w/w) versetzt und für 60 min bei 30 °C im Wasserbad geschüttelt. Im Anschluss wurde die Probe mit 84 mL destilliertem Wasser in eine 250 mL Schottflasche überführt und für weitere 60 min im Autoklaven bei 121 °C erhitzt. Nach Abkühlung wurde die Probe mittels 0,45 µm Glasfaserfilter filtriert. Die Flüssigphase wurde entgegen der Methode nach Sluiter et al. (2006) mit Natriumhydroxid (≥99 %, Roth, GER) neutralisiert und mittels HPAEC-PAD (siehe Kapitel 4.5.1) analysiert.

4.1.3. LIGNINGEHALT

Nach Sluiter et al. (2006) (Sluiter, Hames et al. 2006) wird der säureunlösliche Filtrerrückstand aus Kapitel 4.1.2 vereinfacht als Lignin definiert. Somit erfolgt die Bestimmung des Lignins durch Auswiegen des Filtrerrückstandes.

4.1.4. STICKSTOFFGEHALT

Der Stickstoffgehalt wird als Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt (Hames, Scarlata et al. 2008). Dazu wurde ca. 1 g Probe in einen Kjeldahlkolben eingewogen und mit 10 mL konzentrierter Schwefelsäure, einem Kjehltrap (5 g Kaliumsulfat und 5 mg Selen), Entschäumer und Siedesteine versetzt. Der thermische Aufschluss erfolgte in einem Gerhardt Kjeldatherm (GER) mit dem in Tabelle 4-1 angegebenen Temperaturprofil.

TABELLE 4-1 TEMPERATURPROFIL DES STICKSTOFFAUFSCHLUSSES

Zeit [min]	Temperatur [°C]
30	100
120	210
60	360
10	410
20	420
30	21

Durch die Oxidation der Probe wird eine vollständige Überführung des Stickstoffes in Ammoniumstickstoff erreicht. Nach Natriumhydroxid-Zugabe bildet sich Ammoniumsulfat Ammoniak, das destillativ abgetrennt und in Borsäure eingeleitet wird. Dort reagiert das Ammoniak stöchiometrisch zu Natriumborat. Überschüssige Borsäure wird mit Lauge zurücktitriert, die zur Stickstoffberechnung herangezogen wird. Die Destillation und Titration wurden vollautomatisch in dem Vapodest (Gerhardt, GER) durchgeführt.

4.1.5. ASCHEGEHALT

Die Bestimmung des Ascheanteils wurde nach Sluiter (2008) (Sluiter, Hames et al. 2008) mit dem in Kapitel 4.1.3 zurückgewogenem Rückstand durchgeführt. Dazu wurde die Probe bei 550 °C im Muffelofen (Heraeus Instruments, MR 260 E, GER) für 8 h verascht.

4.2. ENZYMCHARAKTERISIERUNG

Die Enzymcharakterisierung erfolgte für die Cellulasen, da diese Aktivitäten die entscheidenden der enzymatischen Hydrolyse sind. Die Charakterisierung von Xylanasen etc. wurde nicht durchgeführt, da die Hemicellulose unter allen Bedingungen, in denen die Cellulasen aktiv sind, vollständig hydrolysiert wurde. Die katalytische Cellulase-Aktivität wird in FPU (Filter Paper Units) angegeben und wurde nach der NREL Methode nach Adney und Baker (1996) durchgeführt. (Adney and Baker 1996)

Für die Enzymcharakterisierung wurde der pH-Wert sowie die Temperatur variiert und bei jedem Versuch wurde das Enzym (Biogazyme 2x, ASA-Spezialenzyme, GER) in einem Eppendorf-Tube (GER) mit einem Whatman Filterpapierstreifen und 9 mL Pufferlösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Enzym denaturiert um die Hydrolyse zu stoppen. Der Überstand wurde mittels Zentrifuge (Biofuge A, Heraeus Sepatech, GER) abgetrennt und mittels DNS-Lösung (Dinitrosalicylsäure) wurden die reduzierenden Enden (entspricht den Glucoseäquivalten) in einem Photometer (Specord 40, Wellenlänge von 540 nm, Analytik Jena, GER) analysiert. Mittels externer Glucosekalibrierung kann die Glucoseäquivalente der Enzymlösung quantifiziert werden. (Adney and Baker 1996)

4.3. VORBEHANDLUNGEN

Die Vorbehandlung der Biomasse erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird die Biomasse mechanisch zerkleinert und anschließend thermo-/chemisch vorbehandelt. Diese Techniken werden in den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 näher erläutert.

4.3.1. MECHANISCHE VORBEHANDLUNG

4.3.1.1. MÜHLEN

Um die Biomasse zu zerkleinern, standen verschiedene Mühlen zur Verfügung. In Tabelle 4-2 sind die verschiedenen Mühlen mit den, möglichen Sieben aufgezeigt.

TABELLE 4-2 VERWENDETE MÜHLENTYPEN

Mühle	Hersteller	Siebporengröße
Ultrazentrifugalmühle (ZM 2000)	Retsch, GER	2; 1, 0,75; 0,25 mm
Kugelmühle (S1000)	Retsch, GER	kein Sieb möglich
Hammermühle (Typ 108)	J.-Kreyenborg & Co., GER	1 mm
Schlagrotormühle (SR 100)	Retsch	1 mm
Schneidmühle (SM 100)	Retsch, GER	kein Sieb möglich
Schlagkreuzmühle (SK100)	Retsch, GER	1 mm
Scheibenschwingmühle (RS 200)	Retsch, GER	kein Sieb möglich

4.3.2. THERMOCHEMISCHE VORBEHANDLUNG

Die thermochemische Vorbehandlung erfolgte mit verschiedenen Systemen. Zum einen wurde das Berghof Bombensystem (Berghof, GER) (Kapitel 4.3.2.1), der Batch-Reaktor von Parr (Parr Instruments, USA) (Kapitel 4.3.2.2) und das Mikrowellensystem (MarsXpress, CEM, GER) (Kapitel 4.3.2.3) zum Katalysatorscreening verwendet. Die in Tabelle 4-3 aufgeführten Chemikalien wurden dabei in diesen Systemen verwendet.

TABELLE 4-3 VERWENDETE CHEMIKALIEN IN DER BIOMASSEVORBEHANDLUNG

Chemikalie	Lieferant	Reinheit
Ammoniak	Alfa Aesar	28 %, p.a.
Natronlauge	Roth	≥ 99 %
Schwefelsäure	Roth	98 % p.a.
Salzsäure	Merck	37 %, rauchend
Wasserstoffperoxid	Merck	30 %, p.a.
Kaliumhydroxid	Merck	99,9 %
Lithiumhydroxid, wasserfrei	Alfa Aesar	99,9 %
Calciumhydroxid	Merck	99,9 %

4.3.2.1. BERGHOF BOMBEN (DRUCKAUFSCHLUSS-SYSTEM)

Das Berghof Bomben-System besteht aus einem Heizblock, der bis zu 12 Aufschlussbomben fasst. Diese Aufschlussbomben enthalten ein Teflon-

Reaktionsgefäß (Reaktionsvolumen max. 50 mL), in dem die Biomasse und die Reaktionslösung hineingegeben werden. Über einen Controller kann die jeweilige Temperatur des Heizblockes eingestellt werden. Die Temperaturen, die für die Versuche untersucht wurden, variierten zwischen 100 und 200 °C. Nach der Reaktionszeit wurden die Aufschlussbomben aus dem Heizblock genommen und in einem Eiswasserbad abgekühlt.

4.3.2.2. PARR-REAKTOR

Der Parr-Reaktor (Parr, USA) (Abbildung 4-1) hat ein Reaktionsvolumen von 1 L und kann mittels elektrischer Bandheizung und einem 7,5 L Wasserdampferzeuger (bis 300 °C/90 bar) und einem Kryostaten (Julabo F43, GER) temperiert werden. Die Temperatursteuerung und Kontrolle läuft dabei über einen Controller und der PC-Software SpecView32. Die Reaktionslösung kann mittels zweier Propellerrührer während der Reaktion durchmischt werden. Eine Probennahme ist während der Reaktion über einen Probennahmehahn möglich.



ABBILDUNG 4-1 AUFBAU DES PARR-REAKTORS

4.3.2.3. MIKROWELLE

Das Mikrowellenaufschlusssystem (MarsXpress, CEM, GER) ist in Abbildung 4-2 abgebildet und fasst bis zu 35 Aufschlussgefäße in einem Drehteller. Die Aufschlussgefäße bestehen aus Teflon und haben ein Reaktionsvolumen von maximal 25 mL. Eine Probendurchmischung oder eine Probennahme ist im Vergleich zum Parr-Reaktor nicht möglich. Für die Vorbehandlung wurden je 0,5 g Probe in ein Teflongefäß eingewogen und mit 5 mL Reaktionslösung versetzt. Anschließend wurde das Überdruckventil und der Deckel mittels Drehmomentschlüssen (1,9 Nm) verschlossen und in den Drehteller gestellt. Alle Proben wurden als 3-fach-Ansatz durchgeführt. Die Aufheizrate und Haltedauer der jeweiligen Versuche variierte und ist in Tabelle 4-4 abgebildet.



ABBILDUNG 4-2 MIKROWELLENSYSTEM DER VORBEHANDLUNGEN

TABELLE 4-4 REAKTIONSBEDINGUNGEN DER MIKROWELLENVERSUCHE

Reaktionstemperatur	Haltedauer	Aufheizzeit	Leistung
[°C]	[min]	[min]	[Watt]
125	5-60	2	300
150	5-60	2	600
175	5-30	3	600
200	5-30	5	600

Die verwendeten Reaktionslösungen können in sauer, pH neutral und basisch kategorisiert werden. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4-5 gezeigt und wurden mit den Chemikalien aus Tabelle 4-3 hergestellt.

TABELLE 4-5 REAKTIONSLÖSUNGEN FÜR DIE MIKROWELLENVERSUCHE

pH < 7	pH neutral	pH > 7
0,1 % H ₂ SO ₄ (w/w)	deionisiertes Wasser	5 %ige NaOH (w/w)
0,65 % H ₂ SO ₄ (w/w)		0,04 % NaOH/2 % H ₂ O ₂ (w/w)
		5 % NH ₃

Nachdem die Proben nach der Reaktionszeit in der Mikrowelle abgekühlt waren, wurden sie in 15 mL Falcon-Tubes (PP, Sarstedt, GER) überführt und 0,5 mL Probe für die Analyse auf gebildete Degradationsprodukte (siehe 4.5.2) entnommen. Anschließend wurde die Lösung auf pH 4.5 eingestellt (mit der Schwefelsäure bzw. Natronlauge aus Tabelle 4-3) und auf 9 mL mit 0,05 molarem Natriumacetatpuffer (NaAc-Puffer, pH 4.5) aufgefüllt. Im Anschluss wurde 1 mL Enzymlösung (100 FPU/g Biomasse Biogazyme 2x) hinzugegeben und die Reaktionslösung wurde, wie in Kapitel 4.4, beschrieben, hydrolysiert.

4.4. ENZYMATISCHE HYDROLYSE

Die enzymatische Hydrolyse erfolgte mit dem Enzym „Biogazym 2x“ (ASA-Spezialenzyme, GER), das in 0,05 molarem Puffer suspendiert wurde. Je nach Versuch variierte der Enzymeinsatz zwischen 5 und 100 FPU/g trockene Biomasse. Für 100 FPU/g Biomasse werden 0,5g Enzym/g Biomasse benötigt. Die Hydrolyse fand in zwei Systemen statt. Das geschüttelte System bestand aus dem Thermoshaker MHR 23 der Firma HLC (GER) und 15 mL Falcon-Tubes (PP, Sarstedt GER), die auf 50 °C temperiert, bei 600 rpm und einer Auslenkung von 1,3 mm geschüttelt und für bis zu 96 h hydrolysiert wurden (Abbildung 4-3).

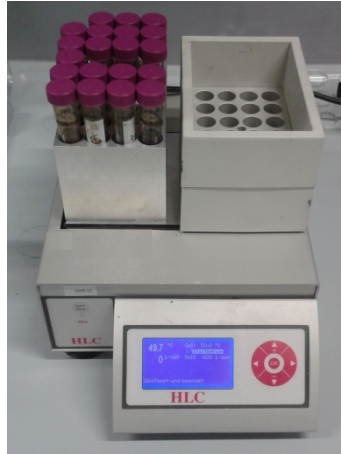


ABBILDUNG 4-3 GESCHÜTTELTES HYDROLYSESYSTEM: HLC THERMOSCHÜTTLER

Das gerührte System bestand aus dem Haake Visco-Tester 550 (Thermo-Fischer Scientific, GER) und einem Wendelrührer. Das System wurde durch einen angeschlossenen Thermostaten (LAUDA E100, GER) auf 50 °C temperiert und mittels PC-Software Haake RheoWin (Thermo Scientific, USA) kann die Rührgeschwindigkeit eingestellt werden. Die eingesetzte Biomasse (6,5 g) wurde je nach Versuch mit bis zu 65 mL NaAc-Puffer (pH 4.5, 0,05 M) und bis zu 100 FPU/g Biomasse versetzt. Die Hydrolysedauer wurde bis zu 168 h variiert.



ABBILDUNG 4-4 GERÜHRTES HYDROLYSESYSTEM: HAAKE VISCOTESTER MIT WENDELRÜHRER

Neben der Hydrolyse mit Biogazym 2x wurde die Biomasse auch mit α -Amylase (Sigma Aldrich, GER) hydrolysiert, um den Glucoseanteil aus Stärke zu ermitteln. Die Stärkeanalyse erfolgte dabei nach Hall (2015) (Hall 2015).

4.5. ANALYTIK MITTELS HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die betriebene instrumentelle Analytik kann in zwei Themen aufgeteilt werden. Zum einen wurden die Zuckermonomere und zum anderen wurden die gebildeten Degradationsprodukte quali- und quantifiziert. Die genutzten Systeme sind in den folgenden Kapiteln 4.5.1 und 4.5.2 genauer beschrieben.

4.5.1. ZUCKER ANALYTIK

Die gebildeten Zuckermonomere wurden mittels Ionenaustauschchromatographie mit gekoppelter amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) identifiziert und quantifiziert. Die genutzte LC-Anlage ICS 5000 (Dionex, Thermo-Fischer Scientific, USA) wird in Tabelle 4-6 genauer spezifiziert. Die zu messenden Proben werden dafür i.d.R. 1:1000 mit 5 mM NaOH verdünnt, sodass die Zuckermonomere in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 50 mg liegen.

TABELLE 4-6 HPAEC-PAD KOMPONENTEN

	Bauteil	Firma
Pumpe	ICS 5000 Dual Pump, inkl. Degasser	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Autosampler	AS-AP Autosampler	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Säule	CarboPac PA-20 (3x150 mm) mit CarboPac PA 20 Vorsäule	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Säulenofen	ICS 5000 DC-Modul	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Detektor	ICS 5000: ED mit Au-und pH Elektrode	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Software	Chromeleon 7.1	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)

Die Auftrennung der Kohlenhydrate erfolgt dabei mittels pH-sensitiven NaOH-Gradient, der zusammen mit weiteren Trennbedingungen in Tabelle 4-7 aufgezeigt ist. Sollte die Verdünnung mit Natronlauge nicht ausreichen, dass die Probe einen neutralen pH-Wert erreicht, muss die Probe im Vorfeld neutralisiert werden.

TABELLE 4-7 TRENNBEDINGUNGEN DER HPAEC-PAD

Trennbedingungen					
Eluenten	A MilliPore Wasser B 10 mM NaOH C 200 mM NaOH D 1 M NaAc mit 25 mM NaOH				
Gradient	Zeit bis [min]	% A	% B	% C	% D
	28,0	50	50	0	0
	30,0	50	0	50	0
	40,0	10	0	50	40
	43,0	0	0	10	90
	43,5	0	0	100	0
	50,0	0	0	100	0
	55,0	50	50	0	0
	65	Ende			
Flow	0,4 mL/min				
Injektionsvolumen	10 µL				
Säulentemperatur	30 °C				

Die verwendeten Zuckerstandards zur Quali-und Quantifizierung sind in Tabelle 4-8 dargestellt.

TABELLE 4-8 VERWENDETE ZUCKERSTANDARDS FÜR DIE QUANTIFIZIERUNG

Zucker	Reinheit [%]	Hersteller
Arabinose	99,0	Dr. Ehrendorfer
Cellobiose	98,5	Dr. Ehrendorfer
Fructose	99,5	Dr. Ehrendorfer
Galactose	98,5	Sigma-Aldrich
Glucose	99,5	Dr. Ehrendorfer
Mannose	99,5	Sigma Aldrich
Rhamnose	99,0	Sigma Aldrich
Xylose	99,5	Dr. Ehrendorfer

4.5.2. NEBENPRODUKTANALYTIK

Die Nebenproduktanalytik erfolgt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit gekoppeltem UV- und RI-Detektor (HPLC-UV/RI). Die verwendete HPLC-Anlage ist in Tabelle 4-9 beschrieben.

TABELLE 4-9 HPLC-RI/UV KOMPONENTEN

	Bauteil	Firma
Pumpe	ICS 5000 Dual Pump, inkl. Degasser	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Autosampler	AS-AP Autosampler	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Säule	HPX-87H (7,8 x 300 mm)	BIORAD (USA)
Säulenofen	TC-3000	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
Detektor	UV/VIS: ICS-3000 PDA	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)
	RI: RI-101	Shodex (JPN)
Software	Chromeleon 7.1	Dionex, Thermo-Fischer Scientific (USA)

Die Auftrennung der Nebenprodukte erfolgte mittels isokratischer 5 mM Schwefelsäure. Weitere Trennbedingungen sind in Tabelle 4-10 definiert. Die verwendeten Standards zur Quali- und Quantifizierung jeder Probe sind in Tabelle 4-11 weiter spezifiziert. Die Proben wurden mit deionisiertem Wasser so verdünnt (i.d.R. 1:20), dass die Proben in einem Konzentrationsbereich von 0,1–10 g/L liegen.

TABELLE 4-10 TRENNBEDINGUNGEN HPLC-RI/UV

Trennbedingungen	
Eluenten	5 mM Schwefelsäure, isokratisch
Flow	0,7 mL/min
Injektionsvolumen	25 µL
Säulentemperatur	60 °C
Detektionswellenlänge	210 nm

TABELLE 4-11 VERWENDETE NEBENPRODUKTSTANDARDTS FÜR DIE QUALI- UND QUANTIFIZIERUNG

Nebenprodukt	Reinheit [%]	Hersteller
5-Methylfurfural	99,0	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	≥ 95,0	Sigma-Aldrich
Bernsteinsäure	99,9	Merck
Hydroxyaceton	98,0	Merck
Essigsäure	100,0	Roth
Ethanol	99,5	Roth
Furfural	98,0	Acros
Glycerin	99,5	Roth
HMF	≥98,0	Sigma-Aldrich
Lävulinsäure	> 97,0	Sigma-Aldrich
D/L-Milchsäure	90,5	Dr. Ehrendorfer
Propionsäure	99,0	Alfa Aesar
Xylitol	99,0	Alfa Aesar
γ-Butyrolacton	99,0	Sigma-Alrich

4.6. AUSWERTUNG

Die Auswertung der Zucker- bzw. Nebenproduktkonzentration erfolgte mittels HPLC-Software Chromeleon. Die Umrechnung in den Verzuckerungsgrad (engl. Degree of Saccharification, DOS) erfolgte mit Formel 4-1:

$$DOS = \frac{c_{Zucker\ NREL} \left[\frac{g}{L} \right]}{100} * c_{Zucker\ enzym.\ Hydrolse} \left[\frac{g}{L} \right] \quad 4-1$$

Die Zuckerkonzentration [g/L] wurde dabei mittels analytischem Säureaufschluss der NREL (Sluiter, Hames et al. 2006) bestimmt.

5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

5.1. ROHSTOFFCHARAKTERISIERUNG VON KAFF UND STROH

Die konsequente Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen führt zur Minimierung des Erdöl-Verbrauchs. Dabei müssen nachwachsende Rohstoffe mehrere Kriterien erfüllen, um als Alternative dienen zu können. Zum einen dürfen sie nicht in Konkurrenz zur Lebensmittel- und Futtermittelproduktion stehen, damit die sogenannte „Teller-Tank-Debatte“ vermieden wird. Zum anderen müssen diese Rohstoffe günstig sein, damit die Endprodukte für den Konsumenten bezahlbar bleiben. Des Weiteren müssen sie in großen Mengen verfügbar sein, damit eine kontinuierliche Nutzung möglich ist. Weltweit werden in der Literatur hierfür verschiedene Hölzer (Berlin, Balakshin et al. 2006, Wyman 2007, Kuznetsov, Sudakova et al. 2013, Grilc, Likozar et al. 2014, Sella Kapu and Trajano 2014, Álvarez, Reyes-Sosa et al. 2016), Gräser wie Rutenhirse, Bambus und Zuckerrohr (Chandel, Kapoor et al. 2007, Mesa, González et al. 2010, Pryor and Nahar 2010, Li, Pu et al. 2013, Zhang, Tong et al. 2014, Álvarez, Reyes-Sosa et al. 2016, Wang, Wang et al. 2016) und Erntereste wie Stroh von u.a. Mais, Reis, Soja, und Weizen analysiert (Bjerre, Olesen et al. 1996, Kim, Kim et al. 2003, Saha, Iten et al. 2005, Kumar, Mago et al. 2009, Fu, Mazza et al. 2010, Bals, Gunawan et al. 2013, Bussemaker, Xu et al. 2013, Eisenhuber, Krennhuber et al. 2013, Govumoni, Koti et al. 2013, Humpula, Uppugundla et al. 2014, Li, Merrettig-Bruns et al. 2014, Zheng, Choo et al. 2014). Alternative Rohstoffquellen wie Kaff, Blätter der Zuckerrübe und Schilf wurden dabei in der Literatur bis jetzt nur wenig untersucht. (Parawira, Read et al. 2008, Marti, Berger et al. 2012, Shuai, Chen et al. 2016)

In dieser Arbeit wird der Fokus auf die agrarischen Reststoffe wie Kaff und Stroh gelegt, da diese in Deutschland in großen Mengen zur Verfügung stehen.

Um diese kostengünstigen Rohstoffe zu finden, die für neue Wertschöpfungsketten genutzt werden können (siehe Kapitel 1), müssen diese potentiellen Rohstoffe hinsichtlich ihrer wertgebenden Komponenten charakterisiert werden. Zu den wertgebenden Komponenten zählen Cellulose (Kapitel 3.1.1), Hemicellulose (Kapitel 3.1.2) und Lignin (Kapitel 3.1.3). Um diese drei Komponenten quantifizieren zu können, wird der analytische Säureaufschluss nach Sluiter et al. (2006) durchgeführt. Dabei wird die Biomasse mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt, dass die Kristallinität der Cellulose herabsetzt und die Hemicellulose aus dem Verbund der Lignocellulose herauslöst. Durch anschließende Wasserzugabe und Erwärmung

(121 °C) werden die Polymere in Monomere umgesetzt. (Fan, Gharpuray et al. 1987) Der nicht lösliche Rückstand wird dabei als Lignin definiert, kann aber Rekombinationsprodukte der Zuckermonomere enthalten. Diese Rekombinationsprodukte, auch pseudo-Lignin genannt, können durch ihre neu gebildeten Verknüpfungen nicht mehr aufgeschlossen werden und vermindern die Gesamtzuckerausbeute. (Sannigrahi, Kim et al. 2011, Hu, Jung et al. 2012, Trajano and Wyman 2013) Die NREL Methode nach Sluiter (Sluiter, Hames et al. 2006) ist ein für Holz optimiertes Analyseverfahren, wird jedoch in der Literatur für eine Vielzahl an Lignocellulosen verwendet. Um die Vergleichbarkeit der eigenen Ergebnisse mit der Literatur sicherzustellen, wird in dieser Arbeit daher ebenfalls dieses Verfahren genutzt. (Chang and Holtzaple 2000, Chen, Zhao et al. 2009, Cherubini and Strömman 2010, Pedersen and Meyer 2010, Gao, Kumar et al. 2014) Die Zuckerkonzentrationen, die mit diesem Verfahren ermittelt werden, werden als 100 % des möglichen Zuckers definiert, auch wenn der reale Wert darüber liegen kann, da wie oben genannt, Rekombinationsprodukte entstehende können, die nicht mit diesem Verfahren quantifiziert werden.

In den folgenden Tabellen werden die untersuchten Rohstoffe charakterisiert. Der ideale Rohstoff verfügt über einen hohen Zuckeranteil und einem möglichst geringen Ligninanteil, da Lignin durch die komplexe Struktur mit den Enzymen und zum Teil auch mit den hydrolysierten Kohlenhydraten interagieren kann und so die Hydrolyse und die maximale Zuckerausbeute stört. (Xiao, Zhang et al. 2004, Kristensen, Felby et al. 2009)

In Tabelle 5-1 werden Weizenkaff Proben aus den Jahren 2012–2015 charakterisiert. Aufgetragen sind in allen Rohstoffcharakterisierungen die Zuckermonomer-, der Gesamtzucker-, der Lignin-, der Stickstoff-, der Asche- und der Wasseranteil.

TABELLE 5-1 CHARAKTERISIERUNG VON WEIZENKAFF- NACH NREL-METHODEN (KAPITEL 4.1), ANGABEN IN G/G BIOMASSE

Weizenkaff				
Erntejahr	2012	2013	2014	2015
Herkunft	Sickte	Bernburg	Adenstedt	Adenstedt
Sorte	Elixer	Cubus	Elixer	Elixer
Arabinose	0,10	0,04	0,04	0,05
Galactose	0,02	0,08	0,02	0,01
Glucose	0,21	0,28	0,28	0,31
Glucose aus Stärke	0,01	0,01	0,01	0,00
Xylose	0,23	0,16	0,26	0,25
Mannose	0,00	0,00	0,00	0,00
Fructose	0,00	0,00	0,00	0,00
Σ Zucker	0,57	0,57	0,61	0,62
Lignin	0,21	0,21	0,22	0,19
Stickstoff	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Asche	0,08	0,10	0,09	0,08
Wasser	0,14	0,12	0,08	0,11

Die getesteten Rohstoffe bestehen aus zwei verschiedenen Winterweizensorten (Elixer bzw. Cubus) und wurden in unterschiedlichen Gebieten angebaut. Der Gesamtzuckeranteil liegt bei allen Proben bei ~ 60 %, wobei der Celluloseanteil (Glucose) bis zu 10 % bei der Ernte 2012 zu Ernte 2015 variiert. Auch die Zuckermonomere aus der Hemicellulose variieren zwischen den verschiedenen Sorten und Jahren. So weist der Cubus Weizen aus dem Jahr 2013 einen Galactoseanteil von 8 % auf, während die anderen charakterisierten Sorten zwischen 1–2 % aufweisen. Die Lignin-, Stickstoff- und Ascheanteile variieren nicht signifikant. Der Wasseranteil hingegen variiert zwischen 8 und 14 %. Diese geringen Unterschiede können durch die Länge und Art der Trocknung der Biomassen erklärt werden. Die teils geringen Unterschiede der Biomassenzusammensetzung lässt sich durch saisonale und regionale Faktoren erklären. Im Kontext mit der Literatur weist Duguid (2007) einen

verzuckerbaren Anteil von ~ 60 %, und Anders (2014) einen Anteil von 57 % nach. Der Ligninanteil variiert dabei zwischen ~ 20% (Duguid 2007) sowie 24 % (Anders 2014), wodurch auch dieser Biomassenanteil mit den Literaturdaten übereinstimmt.

Im Einklang mit den genannten Literaturdaten entspricht die Zusammensetzung von Weizenkaff den zuvor definierten Anforderungen für eine geeignete Biomasse, da der Hauptbestandteil von 60 % aus verzuckerbaren Kohlenhydraten besteht und der Ligninanteil, im Vergleich zu anderen Lignocellulosen mit 20 % gering ist.

Im Vergleich dazu ist in Tabelle 5-2 das Weizenstroh derselben Sorten, Orte und Jahre charakterisiert.

TABELLE 5-2 CHARAKTERISIERUNG VON WEIZENSTROH NACH NREL-METHODEN (KAPITEL 4.1), ANGABEN IN G/G BIOMASSE

Weizenstroh				
Erntejahr	2012	2013	2014	2015
Herkunft	Sickte	Bernburg	Adenstedt	Adenstedt
Sorte	Elixer	Cubus	Elixer	Elixer
Arabinose	0,03	0,02	0,03	0,03
Galactose	0,09	0,07	0,06	0,05
Glucose	0,16	0,14	0,16	0,15
Xylose	0,17	0,14	0,15	0,16
Mannose	0,00	0,00	0,00	0,00
Fructose	0,00	0,00	0,00	0,00
Σ Zucker	0,45	0,37	0,40	0,39
Lignin	0,28	0,26	0,26	0,28
Stickstoff	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Asche	0,15	0,19	0,13	0,15
Wasser	0,12	0,18	0,21	0,18

Die Varianzen, die die verschiedenen Kaff Sorten aufweisen, lassen sich in den Strohproben nicht wiederfinden. Das Stroh weist zudem eine ganz andere Zusammensetzung auf als Kaff, obwohl beide Weizenteile von denselben Pflanzen stammen. Stroh besteht zu ~ 40 % aus verzuckerbaren Anteilen, wobei es zwischen den Pflanzen nur minimale Unterschiede gibt. Der Ligninanteil ist im Vergleich zu Kaff um ~ 8 % höher und der Ascheanteil variiert zwischen 13 – 19 %, ist aber im

Vergleich zu Kaff ebenfalls erhöht. Der erhöhte Ligninanteil lässt sich durch die Funktion des Strohhalms erklären, da dieser im Vergleich zu Kaff eine deutlich höhere Stabilität aufweisen muss. Im Vergleich zur Literatur weisen Petersen und Meyer (2010) einen verzuckerbaren Anteil von 53 % und einen Ligninanteil von 25 % auf, während Anders (2014) einen Zuckeranteil von 57 % und einen Ligninanteil von 24 % und Mosier (2005) einen verzuckerbaren Anteil von 59 % und einen Ligninanteil von 23 % nachgewiesen hat. Die Literaturdaten des Ligningehaltes weichen nicht signifikant von den eigenen Analysewerten ab, während bei dem Zuckeranteil ein Unterschied von bis zu 20 % festzustellen ist. Dieser signifikante Unterschied kann durch den Glucoseanteil aus dem Weizenkorn erklärt werden. Da in den eigenen Proben teilweise ein sehr hoher Weizenkornanteil vorhanden war, wurden die Körner, das Bruchkorn und der durch das Bruchkorn entstandene Stärkestaub im Vorfeld der Charakterisierung ausgesiebt, um die Rohstoffzusammensetzung des Strohs nicht zu verfälschen. Da nicht nachvollzogen werden kann, ob in den Literaturwerten Glucose aus Stärke vorhanden ist, könnte dies diesen signifikanten Unterschied erklären.

Um die Kaff- und Strohzusammensetzung im Kontext zu anderen potentiellen Rohstoffquellen einschätzen zu können, wurde Gersten-, Soja- und Rapsstroh, Zuckerrübenblätter und Schilf in Tabelle 5-3 charakterisiert. Diese Rohstoffquellen wurden exemplarisch ausgewählt, da sie in großen Mengen verfügbar sind, derzeit keine Verwendung in der stofflichen oder energetischen Nutzung finden und z.T. auch in Deutschland genutzt werden könnten.

TABELLE 5-3 CHARAKTERISIERUNG WEITERER BIOMASSEN NACH NREL-METHODEN (KAPITEL 4.1), ANGABEN IN G/G BIOMASSE, N.A. : NICHT BEKANNT, *: LIGNIN + SÄUREUNLÖSLICHER RÜCKSTAND

	Gersten- stroh	Soja- stroh	Raps- stroh	Rüben- blatt	Schilf (getrocknet)	Weizen- Stroh (zum Vgl. aus Tabelle 5-2)
Erntejahr	2013	2013	2011	2013	2013	2015
Herkunft	Bernburg	n.a.	Bockenem	Braunschweig	Oldenburg	Adenstedt
Sorte	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Elixer
Arabinose	0,03	0,02	0,01	0,05	0,02	0,03
Galactose	0,07	0,02	0,01	0,03	0,05	0,05
Glucose	0,24	0,15	0,19	0,09	0,21	0,15
Xylose	0,13	0,12	0,13	0,02	0,16	0,16
Mannose	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00
Fructose	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00
Σ Zucker	0,47	0,32	0,36	0,21	0,45	0,39
Lignin	0,27	0,24	0,31	0,28	0,39*	0,28
Stickstoff	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Asche	0,09	0,17	0,12	0,16	0,15	0,15
Wasser	0,17	0,27	0,21	0,35	0,02	0,18

Das Gerstenstroh kann in seiner Zusammensetzung mit dem Weizenstroh verglichen werden. Die Unterschiede sind im Vergleich zu Weizenstroh 2012 nicht signifikant. Soja- und Rapsstroh weisen einen ähnlich hohen Zuckeranteil auf wie Weizenstroh, enthalten aber deutlich mehr Lignin. Da Lignin die enzymatische Hydrolyse negativ beeinflussen kann, sind hohe Ligningehalte kritisch zu betrachten. Das Zuckerrübenblatt weist mit 21 % nur einen geringen, verzuckerbaren Anteil auf, was für eine stoffliche Nutzung nachteilig ist, da im Vergleich zu Kaff 66 % mehr Biomasse gebraucht werden würde, um vergleichbare Zuckermengen zu generieren. Schilf weist hingegen vergleichbar hohe Zuckerkonzentrationen zu Weizenstroh auf. Der ermittelte Ligninanteil von 39 % ist sehr hoch, doch diese 39 % entsprechen nicht alleine dem Ligninanteil. Methodenbedingt wird nach Sluiter (Sluiter, Hames et al. 2006) der säureunlöslicher Rückstand quantifiziert. Somit wird auch das säureunlösliche Silikat mit quantifiziert, dass strukturell in Schilf eingelagert ist. Daher kann im Falle des Schilfs nur von säureunlöslichem Rückstand gesprochen werden. (Wang, Deng et al. 2013) Ob der erhöhte Wert ausschließlich durch das enthaltene Silikat begründet werden kann, müsste mit weitergehenden

Untersuchungen analysiert werden. Da dieses jedoch nicht Teil dieser Arbeit ist, können keine Vergleiche zwischen den Ligninanteilen von Stroh oder Kaff mit Schilf getätigt werden.

5.1.1. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass verschiedene Rohstoffquellen als Ressource für die stoffliche Nutzung geeignet sind, da sie einen verzuckerbaren Anteil von > 40 % aufweisen. Der geeignetste Rohstoff dabei ist Kaff, da dieser sogar 60 % an Kohlenhydraten aufweist. Durch seine große Verfügbarkeit von bis zu $1 \cdot 10^6$ Tonnen pro Jahr bietet Kaff ein großes, noch nicht genutztes Potential. Fragestellungen, die für eine erfolgreiche Nutzung noch zu klären sind, sind die Ernte von Kaff sowie die Bereitstellung der Zucker aus diesem Rohstoff. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über Kaff wird sich die weitere Arbeit auf diesen Rohstoff fokussieren. Die Zuckergewinnung aus Kaff wird somit in den folgenden Kapiteln weiter untersucht und diskutiert.

5.2. MECHANISCHE VORBEHANDLUNG VON KAFF

Nachdem die analytische Zuckerkonzentration ermittelt wurde, muss diese maximale Zuckerkonzentration durch Prozesse erreicht werden, die ggf. großtechnisch genutzt werden können. In der Regel dient die mechanische Vorbehandlung der Vergrößerung der Oberfläche, um mehr „Angriffspunkte“ für die thermo-chemische Vorbehandlung und anschließende enzymatische Hydrolyse zu generieren. Außerdem wird durch die Zerkleinerung der Probenmatrix ein homogeneres Probenbild ermöglicht. Prinzipiell wäre es möglich, die Kristallinität und die Kettenlänge der Cellulose so stark zu verringern, dass eine thermo-chemische Vorbehandlung unnötig ist. Da diese Methode jedoch mit einem sehr hohen Energieverbrauch verbunden ist, werden die Rohstoffe nur so weit zerkleinert, bis eine effektive thermo-chemische Vorbehandlung möglich ist. (Millett, Effland et al. 1979, Holtzapfle, Humphrey et al. 1989, Chang and Holtzapfle 2000, Yang and Wyman 2008, Bitra, Womac et al. 2009, Shrotri, Lambert et al. 2013, Wyman 2013, Tumuluru, Tabil et al. 2014) Für die Probenzerkleinerung sind dabei zwei Parameter von entscheidender Bedeutung. Zum einen muss ermittelt werden, welchen Einfluss die Partikelgröße für die anschließende Hydrolyse hat und zum anderen, ob die Wahl der Mühle und die damit korrelierenden Druck-/Scherkräfte einen Einfluss auf die Hydrolyse haben.

5.2.1. EINFLUSS PARTIKELGRÖßE

Um den Einfluss der Partikelgröße zu überprüfen, wurde Kaff mittels Ultrazentrifugalmühle und definierten Siebgrößen (> 2 ; < 2 ; < 1 ; $< 0,75$ sowie $< 0,25$ mm) in die daraus resultierenden Partikelgrößen zerkleinert. Im Anschluss wurde das zerkleinerte Kaff mittels analytischen Säureaufschlusses (Sluiter, Hames et al. 2006) hydrolysiert um zu klären, welche Partikel- bzw. Siebgröße notwendig ist um die maximale Zuckerkonzentration [g/g] zu erreichen. Dies ist in Abbildung 5-1 dargestellt.

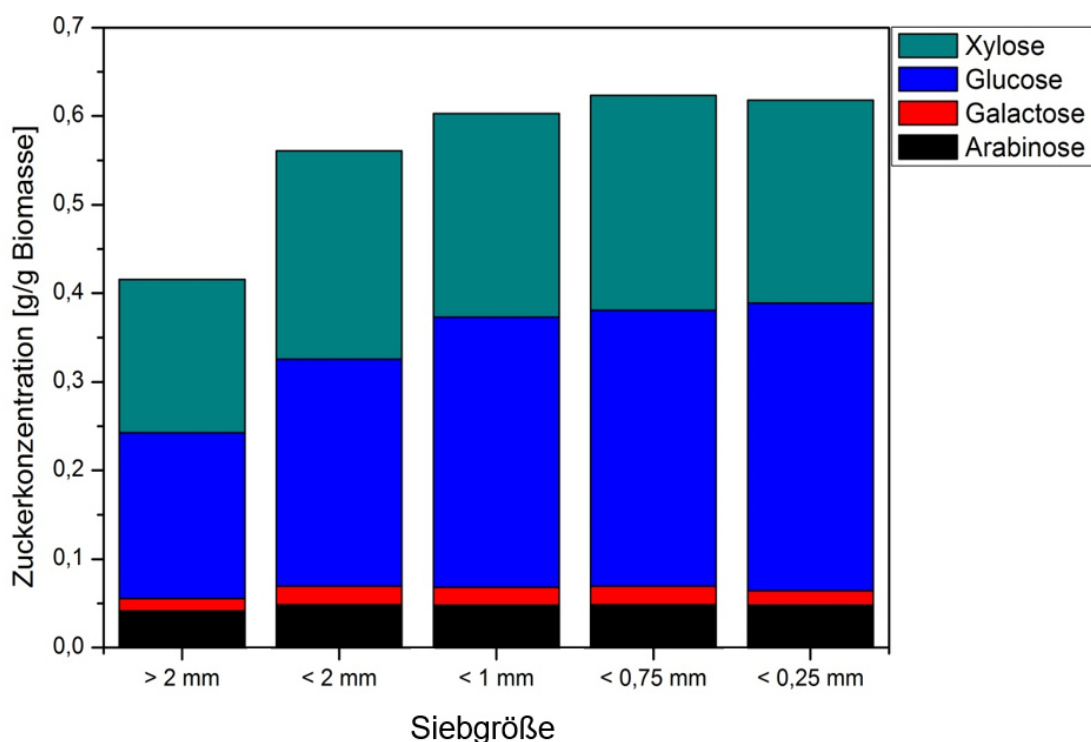


ABBILDUNG 5-1 EINFLUSS DER SIEBGRÖßE UND DER DARAUS RESULTIERENDEN PARTIKELGRÖßE AUF DIE ZUCKERKONZENTRATION [G/G BIOMASSE] VON KAFF NACH DER ANALYTISCHE SÄUREHYDROLYSE NACH SLUITER UND HAMES 2006

Es zeigt sich, dass die Partikelgröße einen großen Einfluss auf die maximale Zuckerkonzentration hat. So beträgt die Gesamtzuckerkonzentration von Partikeln > 2 mm 0,4 g/g Biomasse. Wird die Partikelgröße weiter verkleinert und die Oberfläche somit vergrößert, wird eine maximale Zuckerkonzentration von 0,62 g/g Biomasse erzielt. Dieser Wert wird bereits bei Partikeln von einer Siebmaschenweite von $< 0,75$ mm erzielt und wird auch durch eine weitere Reduzierung der Maschenweite

nicht weiter erhöht. Somit ist die beste Siebgröße für Weizenkaff $< 0,75$ mm, um die maximale Zuckerkonzentration zu erreichen. Ob diese Siebgröße auch im Hinblick auf Energiekosten für einen technischen Prozess sinnvoll ist, oder ob hierfür eine Maschenweite von < 1 mm oder sogar < 2 mm sinnvoller sind, müsste mittels Kostenanalyse außerhalb dieser Arbeit für den jeweiligen Prozess genau berechnet werden, da zwischen den Maschenweiten nur teils geringe Unterschiede zu erkennen sind.

Da Silva et al. (da Silva, Inoue et al. 2010) untersuchte für Zuckerrohr und Sorghumhirse den Einfluss des Mahlgrades in einer Kugelmühle. Sie untersuchten u.a. dabei die Zeit des Vermahlens zwischen 30 und 120 min. Ihr Fazit ist vergleichbar zu den eigenen Ergebnissen, da sie nach einer Zerkleinerungszeit von 60 min keine Verbesserung der erhaltenen Zuckerkonzentration mehr erzielen konnten. Dies bestätigte auch Pedersen et al. (2009) (Pedersen and Meyer 2009), der für Aufschluss mit Sauerstoff und Natriumcarbonat den Einfluss der Partikelgröße untersuchte.

5.2.2. EINFLUSS MÜHLENTYP

Nachdem der Einfluss der Partikelgröße untersucht ist, folgt die Überprüfung des Einflusses des Mühltypes. Es soll geklärt werden, ob Unterschiede bei einer späteren enzymatischen Hydrolyse vorhanden sind, wenn die definierte Partikelgröße mit verschiedenen Mühltypen erzeugt wird, da diese unterschiedliche physikalische Kräfte (Schneiden, Druck, Reibung, Prall und Scherkraft) für die Zerkleinerung des Kaffs nutzen. Um ein breites Spektrum von verschiedenen Mühlen abzudecken, wurden die Ultrazentrifugal-, die Schlagrotor-, die Schneid-, die Schwingscheiben-, die Hammer- und Schlagkreuzmühle verwendet, um Kaff auf eine einheitliche Partikelgröße zu vermahlen. Für diesen Versuch wurde Kaff mit einer Siebgröße und der dazugehörigen Partikelgröße von < 1 mm zerkleinert, da diese Größe bei allen Mühlen außer der Schwingscheibenmühle einstellbar war. Bei dieser wurde das Kaff im Anschluss an den Mahlprozess mittels 1 mm Sieb gesiebt und die Partikel > 1 mm wurden verworfen. Im Anschluss an die Zerkleinerung wurde das gemahlene Kaff mit Biogazyme 2x (ASA Spezialenzyme) enzymatisch hydrolysiert. Damit die verwendete Enzymmenge keinen Einfluss auf die Hydrolyse hat, wurde im Enzym-Überschuss (100 FPU Enzym/g Biomasse) hydrolysiert. Die Optimierung der Enzymmenge erfolgt in Kapitel 5.6.3. In Abbildung 5-2 ist die Gesamtzuckerkonzentration in Abhängigkeit zu den verschiedenen Mühltypen abgebildet.

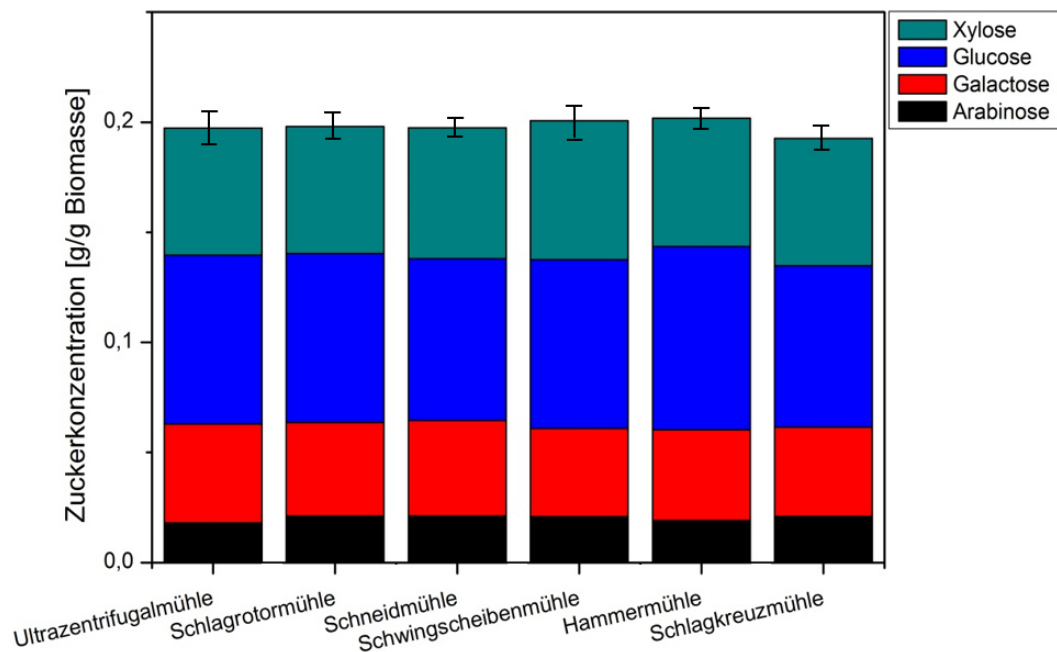


ABBILDUNG 5-2 EINFLUSS VON VERSCHIEDENEN MÜHLENTYPEN AUF DIE ZUCKERKONZENTRATION VON KAFF NACH ENZYMATISCHER HYDROLYSE

Durch den Vergleich der verschiedenen Mühlentypen wird deutlich, dass die unterschiedlichen Mühlentypen und die damit verbundenen Zerkleinerungsarten und deren Partikelgrößenverteilung (siehe Anhang, Abbildung 8-1) keinen Einfluss auf die maximale Zuckerkonzentration hat. Durch die unterschiedlichen Wirkungsweisen der Mühlen wäre zu erwarten gewesen, dass die Schneidmühle (die das Kaff in kleine Stücke schneidet) im Gegensatz zur Schwingscheibenmühle (die die Probe durch Scherkräfte zerreibt), geringere Zuckerkonzentrationen aufgrund des kleineren Polymerisationsgrades erzielt. Diese Vermutung kann mit den erlangten Ergebnissen jedoch widerlegt werden. Welche physikalischen Kräfte zur Zerkleinerung des Kaffs anliegen, sind bei einer Partikelgröße von ~1 mm nicht von signifikanter Bedeutung. Für andere, hier nicht untersuchte Partikelgrößen kann dies jedoch abweichen.

Des Weiteren ist in der Abbildung zu erkennen, dass durch die Vermahlung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse nur ~0,2 g/g Biomasse – also 33 % der verfügbaren Zucker aufgeschlossen werden und somit für Folgeprozesse zur Verfügung stehen. Daher reicht eine rein mechanische Vorbehandlung unter diesen Bedingungen nicht aus, um einen effektiven Prozess zu gewährleisten. Eine

Kombination von verschiedenen Verfahren muss somit unter diesen Umständen entwickelt werden.

5.2.3. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Untersuchung hinsichtlich der Partikelgröße von Kaff konnte gezeigt werden, dass dieser Parameter einen signifikanten Einfluss auf den Folgeprozess hat. Ab einer Sieb- bzw. Partikelgröße von $< 0,75$ mm wird das Maximum der Zuckerkonzentration erreicht. Eine Verringerung der Partikelgröße führt ab diesem Punkt zu keiner Erhöhung der Zuckerkonzentration, da diese sich ab 0,75 mm auf einem Plateau von 0,6 g/g Zucker befindet.

Der Einfluss von verschiedenen Mühlentypen und damit verbundenen physikalischen Kräften hat bei der getesteten Partikelgröße keinen signifikanten Einfluss gezeigt. Somit können die Proben mit allen Mühlentypen zerkleinert werden, ohne Zuckerverluste wahrnehmen zu müssen. Durch diese Experimente konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein gekoppeltes Verfahren zwischen der physikalischen und thermo-chemischen Vorbehandlung notwendig ist, damit die Kohlenhydrate mit maximaler Ausbeute genutzt werden können.

Das Standardmahlverfahren für alle weiteren Versuche ist somit die Zerkleinerung mittels Ultrazentrifugalmühle auf eine Partikelgröße von $< 0,75$ mm, da mit dieser Mühle die Partikelgröße genau eingestellt werden kann und somit maximale Zuckerkonzentrationen möglich sind.

5.3. VERGLEICH DER THERMOCHEMISCHEN REAKTIONSSYSTEME

Im Anschluss an die mechanische Zerkleinerung erfolgt die thermo-chemische Vorbehandlung. Um diese zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Reaktionssysteme hinsichtlich ihrer Aufheizrate untersucht. Die Aufheizrate ist einer der größten Einflussfaktoren bei der thermo-chemischen Vorbehandlung, da bereits Saeman 1945 und Fagan 1971 (Saeman, Moore et al. 1954, Fagan, Grethlein et al. 1971) zeigten, dass der Abbau von Kohlenhydratpolymeren in Monomere und die Bildung von Zuckerdegradationsprodukten stark voneinander abhängen. Diese Abhängigkeit ist in Abbildung 5-3 dargestellt.

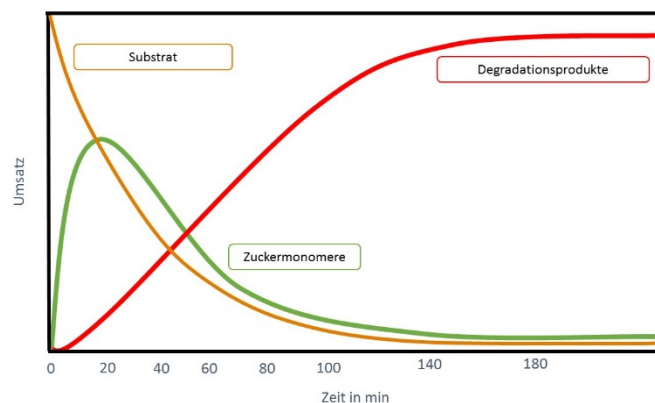


ABBILDUNG 5-3 ZELLSTOFF-KOHLLENHYDRATHYDROLYSE UNTER SAUREN BEDINGUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT (0,8 % H_2SO_4 , 180 °C), VERÄNDERT NACH (SAEMAN, MOORE ET AL. 1954, GIRISUTA, DUSSAN ET AL. 2013)

Die schnelle Hydrolyse des Substrates ist nach Reaktionsbeginn gekoppelt mit einem hohen Umsatz an Zuckermonomeren. Mit fortschreitender Reaktionsdauer nimmt der Kohlenhydratmonomeranteil wieder ab und die Umsetzung der Zuckermonomere in Degradationsprodukte beginnt, bis alle erhaltenen Monomere in Degradationsprodukte abgebaut wurden. Durch diese Erkenntnis ist es notwendig, ein Reaktionssystem zu nutzen, dass die Biomasse, mit den zu testenden flüssigen Katalysatoren der Vorbehandlung, schnellstmöglich auf die gewünschte Zieltemperatur erhitzen kann. Dafür wurden drei verschiedene Reaktionssysteme untersucht. Das Druckaufschluss-System der Firma Berghof [GER], ein gerührter Batch-Reaktor der Firma Parr [USA] und das Mikrowellenaufschlussystem der Firma CEM [GER]. Alle drei Systeme wurden auf die Zieltemperatur von 200 °C eingestellt und mit einem Biomasse/Wasser-Gemisch beladen. Anschließend wurde die Temperatur/Zeit Abhängigkeit dokumentiert und in Abbildung 5-4 dargestellt. Somit

kann die Aufheizrate der Systeme bis zu einer Zieltemperatur von 200 °C verglichen werden.

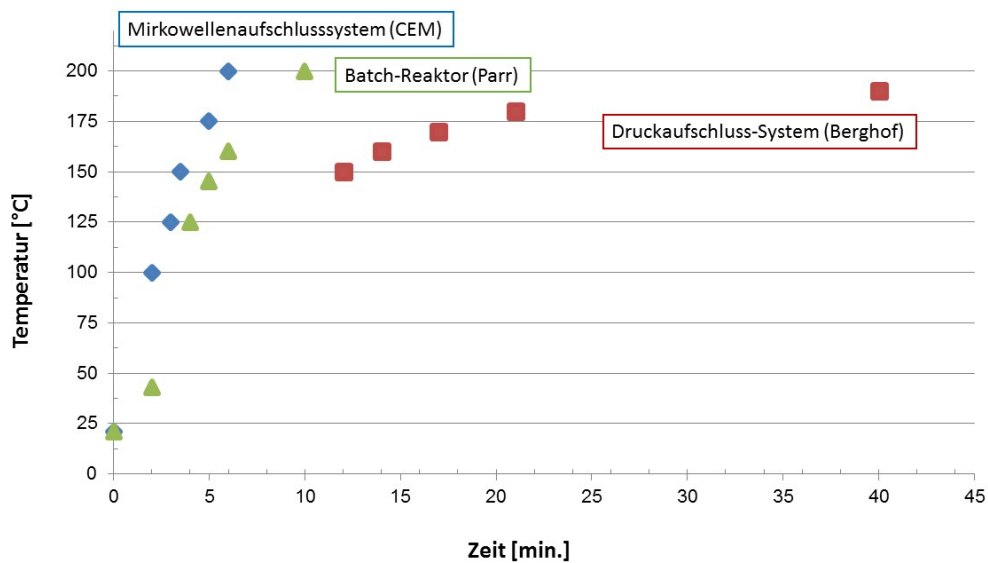


ABBILDUNG 5-4 AUFHEIZRATEN AUF 200 °C DES MIKROWELLENAUFSCHLUSSSYSTEMS, DES BATCH-REAKTORS UND DES DRUCKAUFSCHLUSSREAKTORS

Es ist zu erkennen, dass die Reaktionssysteme unterschiedlich lange benötigen, um die gewählte Zieltemperatur zu erreichen. Durch die Erkenntnisse der o.g. Studien von Saeman und Fagan (Saeman, Moore et al. 1954, Fagan, Grethlein et al. 1971) müssen somit die Systeme genutzt werden, die die geringste Aufheizzeit benötigen, um das in Kapitel 2 definierte Ziel von einer minimalen Degradationsproduktkonzentration zu erfüllen. Das Druckaufschluss-System [Berghof, GER] benötigt dabei die längste Aufheizzeit von 40 min. Nach einer Reaktionszeit von 40 min wären nach Abbildung 5-3 die Hälfte der möglichen Zuckermonomere bereits weiter degradiert. Somit ist dieses System für ein Screening nach thermochemischen Vorbehandlungen nicht geeignet. Der Batch-Reaktor mit Wasserdampferzeuger [Parr, USA] erhitzt das Reaktionssystem innerhalb von 9 min auf die gewünschte Endtemperatur von 200 °C. Durch das große Probenvolumen von bis zu 1 L bietet es die Möglichkeit eine relativ große Menge vorzubehandeln. Jedoch kann mit diesem System immer nur eine Vorbehandlung/ Bestimmung zur Zeit durchgeführt werden. Das Mikrowellensystem [CEM, GER] erhitzt das Reaktionsgemisch innerhalb von 5 min auf die Zieltemperatur von 200 °C und kann mit bis zu 35 Aufschlussgefäßen gleichzeitig betrieben werden. Somit können parallele Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden. Dieses System

erfüllt weiter die genannten Voraussetzungen und wird daher zum Screening und zur Optimierung von thermo-chemischen Vorbehandlungen genutzt.

5.4. OPTIMIERUNG DER THERMO-CHEMISCHEN VORBEHANDLUNG VON KAFF

Die Durchführung der thermochemischen Vorbehandlung soll, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, zu einer Spaltung der intermolekularen Bindungen und Wechselwirkungen der drei Hauptkomponenten führen. In der Literatur werden viele verschiedene Varianten diskutiert, um diverse Rohstoffe bestmöglich vorzubehandeln. Um das beste Verfahren für Kaff zu ermitteln, wurden verschiedene Prozesse, die für Kaff sowie andere Rohstoffe gut funktionieren, herangezogen und als Basis für die Entwicklung einer thermo-chemischen Vorbehandlung genutzt. Generell lassen sich die genutzten thermo-chemischen Vorbehandlungen in die drei Kategorien „sauer, neutral und basisch“ unterteilen. Des Weiteren werden in allen Literaturquellen Zeiten von wenigen Minuten bis zu einer Stunde und Temperaturen von 100 °C bis zu 200 °C genutzt, um die Biomasse vorzubehandeln. (Mosier, Wyman et al. 2005, Sun and Cheng 2005, Kumar, Singh et al. 2008, Chen, Zhao et al. 2009, Kumar, Barrett et al. 2009, Brandt, Ray et al. 2011, Galbe and Zacchi 2012, Bals, Gunawan et al. 2013, Fan, De bruyn et al. 2013, Buratti, Barbanera et al. 2014, Bali, Meng et al. 2015, Álvarez, Reyes-Sosa et al. 2016) Aufgrund der Variationen an Parametern, wurden anhand der entwickelten Tabelle 5-4 alle Kaff Vorbehandlungen untersucht, um die jeweilige optimale Temperatur und Zeit zu erhalten. Um bewerten zu können, was die optimalen Bedingungen sind, wurde jede Probe nach der Vorbehandlung auf Degradationsprodukte untersucht und nach einer standardisierten enzymatischen Hydrolyse wurde die Zuckerkonzentration des Hydrolysates bestimmt, um den Verzuckerungsgrad jeder Variante zu ermitteln. Dabei wurde ein hoher Enzymanteil von 100 FPU/g Biomasse gewählt, um mögliche Enzymeinflüsse ausblenden zu können (Sun and Cheng 2002, Martín, Rocha et al. 2012)

TABELLE 5-4 TEMPERATUR/ZEIT SCHEMA FÜR THERMOCHEMISCHE VORBEHANDLUNGEN

Temperatur [°C]	Zeit [min]			
21	5	10	30	60
125	5	10	30	60
150	5	10	30	60
175	5	10		
200	5	10		

In den folgenden Kapiteln 5.4.1 bis 5.4.3 werden nun die erzielten Ergebnisse der sauren, neutralen und basischen Vorbehandlungen diskutiert.

5.4.1. SÄUREKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG

Die mittels Säure katalysierte Vorbehandlung ist die wohl am längsten untersuchte Vorbehandlung für NaWaRos, da diese schon im 19. Jahrhundert genutzt wurde. Die Funktionsweise beruht dabei darauf, dass die Säure als erstes die Hemicellulose aus dem Lignocelluloseverbund hydrolysiert und somit der Strukturverbund aufgebrochen wird. Die erhaltenen Monomere liegen anschließend in der sauren Lösung vor. Die Säure hydrolysiert auch die Cellulose, da dies jedoch länger benötigt als die Hydrolyse der Hemicellulose, muss der Punkt gefunden werden, indem der Strukturverband gelöst ist um die weitere Hydrolyse in Degradationsprodukte zu verhindern. (Wenzl Hermann 1954, Trajano and Wyman 2013) Der Mechanismus der säurekatalysierten Hydrolyse ist in Kapitel 3.3 dargestellt. In der Literatur werden nur die Salz- und die Schwefelsäure berücksichtigt, da diese die besten Resultate erzielen und im Vergleich zu anderen organischen Säuren deutlich kostengünstiger sind. Da Salzsäure jedoch im Vergleich zur Schwefelsäure höhere korrosive Eigenschaften aufweist, wird bei der Vorbehandlung von Weizenkaff mit Schwefelsäure gearbeitet. Diese Untersuchungen werden mit 0,1 und 0,65 wt.%iger Schwefelsäure durchgeführt, da Martin 2007, Saeman 1954, Abatzoglov 1986, Brennan 2004 und Lloyd 2003 sowie Taherzadeh 2007 und Galbe 2012 (Saeman, Moore et al. 1954, Abatzoglov, Bouchard et al. 1986, Brennan and Wyman 2004, Lloyd and Wyman 2005, Martin, Alriksson et al. 2007, Taherzadeh and Karimi 2007, Galbe and Zacchi 2012) zeigen, dass eine optimale Vorbehandlung mit Schwefelsäurekonzentrationen < 1 % für viele Biomassen, u.a. Weizenstroh, möglich ist. In der folgenden Tabelle 5-5 ist der Verzuckerungsgrad (DOS) der 0,1 wt.% Säure abgebildet. Ein Verzuckerungsgrad von 100% entspricht dabei dem erreichten Zuckerwert, der nach Sluiter et al. (2006)

(Kapitel 4.1.2) festgelegt wurde. Die Tabelle 5-6 zeigt im Anschluss die während der Vorbehandlung auftretenden Degradationsprodukte auf.

TABELLE 5-5 VERZUCKERUNGSGRAD DER SÄUREKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 0,1 % H_2SO_4 UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	55,9	4,0	1,5	12,0	31,0	11,4
	10	50,3	5,7	1,0	11,1	27,7	10,5
	30	51,7	1,4	1,4	10,9	28,9	10,5
	60	52,3	2,7	1,4	11,0	29,2	10,7
125°C	5	48,5	4,2	1,4	9,2	26,8	11,2
	10	47,7	5,5	1,1	8,5	25,9	12,2
	30	61,8	4,3	2,5	8,8	33,4	17,1
	60	75,1	12,4	3,4	9,6	39,4	22,5
150°C	5	73,4	9,5	2,9	10,1	38,6	21,8
	10	70,5	8,8	2,2	8,6	37,3	22,4
	30	91,1	5,9	4,0	8,1	47,7	31,3
	60	82,6	5,3	3,4	8,4	43,5	27,3
175°C	5	82,9	12,9	3,5	9,2	43,0	27,2
	10	81,4	8,8	1,9	7,1	46,5	25,9
	30	59,0	7,7	0,3	8,3	47,1	3,3
200°C	5	64,3	7,6	1,2	7,1	45,9	10,1
	10	53,8	9,0	0,3	6,8	43,5	3,1

TABELLE 5-6 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [g/L] DER SÄUREKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 0,1 % H₂SO₄ BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, N.D.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T [°C]	t [min]	Acetat [g/L]	Formiat [g/L]	Furfural [g/L]	HMF [g/L]
21°C	5	3,40	0,15	n.d.	n.d.
	10	3,52	0,17	n.d.	n.d.
	30	3,33	0,18	n.d.	n.d.
	60	3,61	0,14	n.d.	n.d.
125°C	5	3,19	0,19	n.d.	n.d.
	10	3,31	0,22	n.d.	n.d.
	30	3,53	0,20	n.d.	n.d.
	60	3,69	0,20	n.d.	n.d.
150°C	5	3,56	0,11	n.d.	n.d.
	10	3,44	0,18	0,10	n.d.
	30	3,31	0,47	0,10	n.d.
	60	3,78	1,10	1,50	0,08
175°C	5	3,05	0,76	0,53	0,10
	10	3,10	1,81	0,51	0,07
	30	5,37	1,22	0,40	0,06
200°C	5	5,32	0,76	2,64	0,86
	10	6,87	0,87	1,41	0,98

Es ist zu erkennen, dass bei niedrigen Temperaturen die Säurekonzentration nicht ausreicht, um den Lignin/Xylose/Cellulose-Komplex ausreichend vorzubehandeln, damit die Enzyme eine vollständige Hydrolyse ermöglichen. Mit steigender Temperatur und Zeit erhöht sich der Verzuckerungsgrad und hat sein Optimum bei 150 °C und 30 min bei einem Verzuckerungsgrad von 91,9 %. Eine fortschreitende Reaktionszeit und eine weitere Erhöhung der Temperatur führt dazu, dass der Verzuckerungsgrad, verstärkt im Bereich der Xylose, wieder sinkt. Werden diese Tendenzen mit der Bildung der Abbauprodukte verglichen, kann festgestellt werden, dass mit steigender Temperatur und Zeit die Bildung von Degradationsprodukten vermehrt stattfindet. Dies lässt sich durch die Degradation der leicht zu hydrolysierenden Hemicellulose erklären. Dieses Verhalten kann durch die Ergebnisse von Saeman und durch den beschriebenen Mechanismus von Rasmussen (Saeman, Moore et al. 1954, Rasmussen, Sørensen et al. 2014) bestätigt werden. Die Bildung des Acetats kann im Vergleich zu HMF, Lävulinsäure oder Formiat nicht verhindert werden, da Hemicellulose teilacetyliert ist und dies bei der Hydrolyse als Acetat abgespalten wird.

Bei der Verwendung von 0,65 %iger Schwefelsäure ist ein vergleichbarer Trend der Vorbehandlung zu erkennen (siehe Tabelle 5-7). Durch die Erhöhung der Säurekonzentration sind die optimalen Bedingungen für einen Verzuckerungsgrad von 93,6 % bereits bei 30 min und 125 °C erreicht. Die Verwendung der konzentrierteren Säure bewirkt somit eine Senkung der Reaktionstemperatur. Die Bildung von Degradationsprodukten korreliert ebenfalls mit den zuvor gewonnenen Erkenntnissen, die in Tabelle 5-8 dargestellt ist.

TABELLE 5-7 VERZUCKERUNGSGRAD DER SÄUREKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 0,65 % H_2SO_4 UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	19,8	11,0	1,0	8,1	6,0	4,7
	10	38,0	3,1	1,0	9,9	20,7	6,4
	30	47,6	4,6	1,1	13,2	25,7	7,6
	60	38,6	5,1	0,8	8,8	23,7	5,3
125°C	5	82,2	0,6	4,0	11,3	41,4	25,5
	10	86,1	1,6	4,3	13,4	43,8	24,5
	30	93,6	2,9	4,8	13,8	46,7	28,3
	60	81,1	2,6	4,0	12,6	40,8	23,7
150°C	5	76,4	6,1	3,4	11,2	41,1	20,8
	10	84,4	5,6	4,0	12,6	42,7	25,1
	30	59,5	6,6	2,2	10,9	38,7	7,6
	60	48,8	6,0	0,6	12,9	34,6	0,7
175°C	5	62,6	2,8	2,6	11,2	39,5	9,3
	10	66,1	4,6	2,5	10,9	40,3	12,4
	30	41,9	5,6	0,8	11,2	29,0	0,9
200°C	5	49,7	4,4	1,2	7,1	45,9	10,1
	10	56,1	2,9	0,3	6,8	43,5	3,1

TABELLE 5-8 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [g/L] DER SÄUREKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 0,65 % H₂SO₄ BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, N.D.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T [°C]	t [min]	Acetat [g/L]	Formiat [g/L]	Furfural [g/L]	HMF [g/L]	Lävulinsäure [g/L]
21°C	5	3,65	0,16	n.d.	n.d.	n.d.
	10	3,10	0,13	n.d.	n.d.	n.d.
	30	3,16	0,17	n.d.	n.d.	n.d.
	60	3,87	0,19	n.d.	n.d.	n.d.
125°C	5	4,01	0,22	0,06	n.d.	n.d.
	10	3,85	0,19	0,08	n.d.	n.d.
	30	3,87	0,21	0,19	0,82	0,02
	60	3,29	0,29	0,26	0,75	0,14
150°C	5	3,48	0,20	0,21	0,18	0,06
	10	3,59	0,19	0,24	0,16	0,27
	30	3,23	0,26	1,41	0,19	0,44
	60	3,58	0,31	1,89	2,23	0,58
175°C	5	4,01	0,28	1,53	0,87	0,85
	10	3,62	0,33	1,86	0,96	0,74
	30	3,88	0,51	1,47	1,05	0,84
200°C	5	4,31	0,65	2,44	0,91	0,78
	10	5,78	0,78	1,38	1,03	0,95

Unter den optimalen Bedingungen (125 °C, 30 min) der 0,65 %igen Schwefelsäure werden 0,21 g/L Formiat 0,19 g/L Furfural, 0,82 g/L HMF und 0,02 g/L Lävulinsäure gebildet. Im Vergleich dazu wurde unter der Verwendung von 0,1 %iger Schwefelsäure kein HMF gebildet, was lt. Rasmussen et al. und Belitz et al. (Belitz, Grosch et al. 2008, Rasmussen, Sørensen et al. 2014) typisch für saure Bedingungen unter Hitzeeinwirkungen ist.

Im Vergleich der beiden sauren Prozesse funktioniert die 0,65 %ige Vorbehandlung bei 125°C und 30 min effektiver, da sie eine geringere Reaktionstemperatur erfordert und dabei einen leicht erhöhten Verzuckerungsgrad gegenüber der 0,1 %igen Säurevorbehandlung aufweist. Da die Differenz der Summe der gebildeten Degradationsprodukte nicht signifikant variiert, ist dies kein ausschlaggebendes Kriterium. Allerdings erfordert der geringfügig höhere Verzuckerungsgrad mit 0,65 % Säure die 6-fach höhere Säuremenge, die in den Folgeprozessen wieder entfernt werden müsste. Ob es kostengünstiger ist, mehr Säure einzusetzen oder höhere Temperaturen bei der Vorbehandlung zu wählen, müsste finanziell durchkalkuliert werden, um die kostengünstigere Methode zu definieren.

In der Literatur erreicht Saha et. al. (Saha, Iten et al. 2005) bei Weizenstroh mit einer 0,5 v/v % verdünnten Schwefelsäurevorbehandlung bei 140 °C, einer Reaktionszeit von 30 min und einer anschließenden enzymatischen Hydrolyse mit einer Mischung aus Celluclast, Novozyme 188 (Novozymes, USA) und Viscostar 150 L (Dyadic, USA) mit insgesamt ca. 60 FPU/g einen Verzuckerungsgrad von 72 %. Im Vergleich dazu kann unter vergleichbaren Reaktionbedingungen der Vorbehandlung ein signifikant höherer Verzuckerungsgrad erzielt werden. Ein Unterschied liegt jedoch in der Wahl und Menge der eingesetzten Enzyme/Enzymmischungen. Diese Optimierung wird in Kapitel 5.6 weiter diskutiert.

5.4.2. NEUTRALE BZW. LÖSEMittelKATALYSIERTE VorBEHANDLUNG

Die Vorbehandlung im neutralen pH Bereich erfolgt durch die Verwendung von Lösemitteln (Ethanol) oder Flüssigkeiten wie Wasser. Ziel soll wie in Kapitel 2 beschrieben eine Vorbehandlung sein, bei der alle Fraktionen zusammen weiter verwendet werden können und die Cellulose nicht separat von der Hemicellulose verwendet wird. Daher kommen Alkohole als Lösemittel nicht in Betracht. Das Liquid Hot Water- Verfahren soll im Weiteren untersucht werden, da es viele Vorteile aufzeigt. So werden keine Chemikalien verwendet, wodurch Prozesskosten (Anschaffung, Aufreinigung und Wiedergewinnung der Reaktionslösung/Lösemittels) gesenkt werden. Das Wasser wird bei dieser Methode unter Druck stark erhitzt, was zu einer Autopyrolyse des Wassers führt. Unter diesen Bedingungen werden auch die Acetylgruppen der Hemicellulose abgespalten, welche unter den wässrigen Bedingungen zu Essigsäure hydratisieren und somit zu einem sauren Reaktionsmilieu führen. Durch die saure Umgebung kann die Hemicellulose aus dem Lignocelluloseverbund hydrolysiert werden. Die Abbaureaktionen laufen identisch zu der säurekatalysierten Vorbehandlung ab. (Mosier, Hendrickson et al. 2005, Pérez, Ballesteros et al. 2008, Alvira, Tomás-Pejó et al. 2010)

In Tabelle 5-9 sind die Verzuckerungsgrade und in Tabelle 5-10 die gebildeten Degradationsprodukte der jeweiligen LHW Vorbehandlungen aufgezeigt. Es fällt auf, dass der Verzuckerungsgrad bei den Experimenten bis 175 °C sich in den kurzen Zeiten nicht signifikant vom Blindwert unterscheiden. Der DOS bei 150 °C und 30 min zeigt zwar eine Erhöhung von 20 % zum Versuch bei 21 °C, jedoch kann durch die Erhöhung auf 200 °C bei 10 min ein maximaler DOS von 93 % erzielt werden. Dies bedeutet, dass die eigentliche Vorbehandlung erst ab hohen Temperaturen stattfindet und die Vorbehandlungsdauer bei niedrigen Temperaturen keinen großen Einfluss auf die Wirkung der Vorbehandlung hat. Dies kann durch die Autopyrolyse des Wassers erklärt werden, da diese erst bei höheren Temperaturen einen größeren Einfluss bekommt und der pH-Wert erst dann niedrig genug ist, um die Wirkung der Vorbehandlung signifikant zu erhöhen. Die Bildung von Degradationsprodukten beginnt ebenfalls erst mit steigender Temperatur und Reaktionszeit. So werden Furfural und Lävulinsäure erst ab Temperaturen von ≥ 175 °C gebildet.

TABELLE 5-9 VERZUCKERUNGSGRAD DER NEUTRALEN VORBEHANDLUNG LHW VON KAFF MIT ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	58,4	1,2	1,5	14,2	32,1	10,7
	10	53,7	1,8	0,9	13,2	30,0	9,6
	30	56,3	2,5	1,4	13,6	31,0	10,4
	60	57,4	2,2	1,5	13,8	31,5	10,7
125°C	5	52,6	4,1	1,3	9,3	30,1	12,0
	10	57,1	2,1	1,0	10,3	32,7	13,2
	30	55,0	1,4	1,4	9,0	30,7	13,9
	60	55,7	1,0	1,4	8,7	30,3	15,2
150°C	5	59,7	4,6	1,5	10,1	32,4	15,8
	10	57,0	2,8	1,1	9,7	31,1	15,1
	30	77,7	11,6	2,4	11,3	40,4	23,7
175°C	5	63,4	2,4	1,8	8,4	34,3	18,8
	10	64,5	4,1	1,4	8,2	34,9	20,1
	30	60,0	2,4	1,3	8,3	47,1	3,3
200°C	5	87,6	7,0	3,1	9,0	47,4	28,1
	10	93,1	5,8	2,2	8,6	53,7	28,6

TABELLE 5-10 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [g/L] DER NEUTRALEN VORBEHANDLUNG LHW VON KAFF BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, n.d.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T [°C]	t [min]	Acetat [g/L]	Formiat [g/L]	Furfural [g/L]	HMF [g/L]	Lävulinsäure [g/L]
21°C	5	3,70	0,15	n.d.	n.d.	n.d.
	10	4,16	0,17	n.d.	n.d.	n.d.
	30	3,65	0,14	n.d.	n.d.	n.d.
	60	3,60	0,14	n.d.	n.d.	n.d.
125°C	5	2,94	0,08	n.d.	n.d.	n.d.
	10	2,80	0,17	n.d.	n.d.	n.d.
	30	2,95	0,16	n.d.	n.d.	n.d.
	60	3,08	0,16	n.d.	n.d.	n.d.
150°C	5	3,04	0,14	n.d.	n.d.	n.d.
	10	3,12	0,17	n.d.	n.d.	n.d.
	30	3,22	0,18	0,01	n.d.	0,08
175°C	5	3,32	0,15	n.d.	n.d.	n.d.
	10	3,13	0,13	0,02	n.d.	0,01
	30	3,24	0,16	0,06	n.d.	0,11
200°C	5	3,70	0,24	0,01	n.d.	n.d.
	10	3,56	0,33	0,05	n.d.	0,23

Mit einem erzielten Verzuckerungsgrad von 93 % kann auch die LHW Vorbehandlung als sehr effektiv angesehen werden. Allerdings werden bei dieser Vorbehandlung Hemmstoffkonzentrationen der Zuckerdegradationsprodukte von 0,61 g/L gebildet. Dies würde anschließende fermentative Prozesse negativ beeinflussen und somit müssten diese erst durch Downstream-Prozesse entfernt werden. Pérez et al. (Pérez, Ballesteros et al. 2008) hat das LHW-Verfahren für Weizenstroh optimiert und einen Verzuckerungsgrad von 85 % bei einer Temperatur von 214 °C und einer Reaktionsdauer von 2,7 min erreichen können. Somit kann auch für das LHW-Verfahren gezeigt werden, dass vergleichbare Verzuckerungsgrade für Weizenkaff gefunden wurden. Die gestellten Zielparameter eines hemmstofffreien Hydrolysates sind somit noch nicht hinreichend erreicht und weitere Alternativen müssen untersucht werden.

5.4.3. BASENKATALYSIERTE VORBEHANDLUNG

Die mittels Basen durchgeführte Vorbehandlung von Lignocellulose reduziert die Vernetzung der Esterbindungen und löst das Lignin aus dem Lignocelluloseverbund. Des Weiteren quellen amorphe und kristalline Bereiche der Cellulose auf, wodurch eine anschließende enzymatische Hydrolyse verbessert wird. In der Literatur werden dazu häufig Ammoniak oder Natronlauge für Mais, Holz und Stroh verwendet, da diese hohe Verzuckerungsgrade generieren. (Tarkow and Feist 1969, Gáspár, Kálmán et al. 2007, Taherzadeh and Karimi 2007, Chen, Zhao et al. 2009, Cheng, Zheng et al. 2010, Modenbach 2013, Bali, Meng et al. 2015, Yu, Li et al. 2016) Ein großer Vorteil des Ammoniaks ist die leichte Rückgewinnung im Anschluss an die Vorbehandlung, da das Ammoniak durch Destillation leicht abgetrennt werden kann. Die mit Ammoniak erzielten Verzuckerungsgrade sind in Tabelle 5-11 dargestellt. Im Anschluss an diese folgt Tabelle 5-12 mit den dabei generierten Degradationsprodukten.

TABELLE 5-11 VERZUCKERUNGSGRAD DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 5 % NH₃ UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4,8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	52,1	1,9	1,5	6,6	29,6	14,4
	10	52,4	2,4	1,2	6,2	30,0	14,9
	30	53,7	1,1	1,7	6,5	30,4	15,1
	60	56,2	2,0	1,8	6,6	31,9	16,0
125°C	5	66,5	1,9	1,9	4,6	37,4	22,6
	10	70,9	2,4	1,2	4,7	40,8	24,2
	30	92,7	3,1	2,7	5,9	51,3	32,8
	60	89,6	6,9	2,9	3,2	51,0	32,4
150°C	5	85,6	2,0	2,6	3,5	48,8	30,7
	10	85,3	4,8	1,9	4,6	48,6	30,2
	30	83,0	4,1	2,4	9,2	46,1	25,2
175°C	5	91,5	8,6	2,7	5,2	48,0	32,7
	10	82,9	4,0	1,6	5,7	47,0	28,6

TABELLE 5-12 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [g/L] DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 5 % NH₃ BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, N.D.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T [°C]	t [min]	Acetat [g/L]	Hydroxyaceton [g/L]
21°C	5	2,59	n.d.
	10	2,54	n.d.
	30	2,96	n.d.
	60	2,77	< 0,01
125°C	5	2,51	0,02
	10	2,67	0,03
	30	2,94	0,74
	60	3,18	0,81
150°C	5	3,62	0,79
	10	3,30	0,89
	30	3,17	0,91
175°C	5	4,52	1,59
	10	4,68	1,68

Die Vorbehandlung mit Ammoniak erzielt bereits bei Temperaturen von 125 °C und einer Reaktionszeit von 30 min einen Verzuckerungsgrad von 92 %. Mit steigender Reaktionsdauer und auch bei Erhöhung der Reaktionstemperatur kann keine Verbesserung des Verzuckerungsgrades erzielt werden. Die gebildeten Degradationsprodukte zeigen, dass Hydroxyaceton als Hauptabbauprodukt gebildet wird. Ob dieses Zuckerabbauprodukt einen negativen Einfluss auf eine anschließende Fermentation hat, muss für die jeweiligen Mikroorganismen im Einzelnen untersucht werden. Weitere Zuckerdegradationsprodukte werden dabei nicht gebildet, doch ob das Hydroxyaceton ebenfalls durch Downstream-Prozesse entfernt werden muss, kann nicht beurteilt werden.

Mit Erhöhung der Ammoniakkonzentration von 5 auf 10 vol.-% können Verzuckerungsausbeuten von maximal 83 % erzielt werden, das in Tabelle 5-13 dargestellt ist. Die Degradationsprodukte sind für diese Experimente in Tabelle 5-14 aufgeführt.

TABELLE 5-13 VERZUCKERUNGSGRAD DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 10 % NH₃ UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	33,9	4,2	1,2	4,0	18,5	10,2
	10	38,2	1,5	1,0	4,5	21,5	11,2
	30	38,2	2,5	1,4	3,9	21,2	11,7
125°C	5	63,3	1,9	2,3	3,0	35,0	23,0
	10	68,9	3,1	1,5	2,9	38,2	26,2
	30	83,1	7,8	3,4	4,0	44,6	31,1
	60	63,8	4,8	2,6	3,5	33,6	24,1
150°C	5	73,4	3,6	2,6	2,8	41,8	26,2
	10	71,1	5,9	1,8	2,5	40,2	26,6
175°C	5	83,7	3,9	2,8	4,4	47,6	28,8
	10	75,8	3,6	1,5	4,1	44,8	25,4
200°C	5	47,2	1,9	1,0	1,6	18,6	25,9
	10	38,4	9,0	0,8	1,5	15,8	20,4

TABELLE 5-14 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [G/L] DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 5 % NH₃ BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, N.D.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T	t	Acetat	Hydroxyaceton
[°C]	[min]	[g/L]	[g/L]
21°C	5	3,09	n.d.
	10	3,22	n.d.
	30	3,36	n.d.
125°C	5	3,20	0,23
	10	3,62	0,81
	30	3,55	0,82
150°C	5	3,34	0,90
	10	3,48	0,88
175°C	5	3,29	0,97
	10	3,27	0,95
200°C	5	3,17	1,81
	10	3,20	1,51

Als Zucker-Abbauprodukt kann erneut nur das Hydroxyaceton identifiziert werden. Eine signifikante Verbesserung des Verzuckerungsgrades und eine Minimierung der

Degradationsprodukte im Vergleich zu 5 vol.-% NH₃ kann nicht erreicht werden. Mes-Hartree et al. hat bereits im Jahr 1988 Weizenkaff mit Ammoniak vorbehandelt und die Glucose enzymatisch (Celluclast, 80 FPU/g) umgesetzt. Für Kaff gelang ihm bei Glucose ein Verzuckerungsgrad von 34 % (Mes-Hartree, Dale et al. 1988), während die eigenen Experimente 44 % erreichen.

Alternativ zum Ammoniak kann Natronlauge verwendet werden. Die untersuchten Reaktionsbedingungen wurden mit 5 wt.-% Natronlauge durchgeführt (siehe Tabelle 5-16) Der höchste Verzuckerungsgrad von 93 % konnte bei 5 min und 125 °C erreicht werden. Die generierten Degradationsprodukte der Natronlaugevorbehandlung sind in Tabelle 5-16 abgebildet. Abgesehen vom Acetat wird als Hauptdegradationsprodukt erneut Hydroxyaceton gebildet, was nach Belitz et al. (Belitz, Grosch et al. 2008) ein typisches Zuckerabbauprodukt unter stark alkalischen Bedingungen und Hitzeeinwirkungen ist. Somit sind, auch für diese Vorbehandlung eventuell Downstream-Prozesse notwendig.

TABELLE 5-15 VERZUCKERUNGSGRAD DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 5 % NaOH UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h) BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, DOS: VERZUCKERUNGSGRAD, SD: STANDARDABWEICHUNG)

T	t	DOS	SD	Anteil			
				Arabinose	Galactose	Glucose	Xylose
[°C]	[min]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
21°C	5	85,4	4,5	3,2	8,9	46,6	26,7
	10	82,1	3,1	2,1	8,1	46,1	25,8
	30	75,5	2,9	2,4	4,3	43,7	25,1
	60	82,4	1,6	2,5	4,4	47,9	27,6
125°C	5	93,2	7,3	3,8	3,7	51,9	33,8
	10	88,6	5,8	2,6	3,8	49,6	32,6
	30	80,6	5,9	3,0	5,0	46,4	26,2
	60	68,8	5,5	1,7	5,6	44,1	17,4
150°C	5	76,5	5,1	2,2	6,1	48,1	20,1
	10	70,6	8,2	1,0	7,7	47,8	14,2

TABELLE 5-16 GEBILDETE DEGRADATIONSPRODUKTE [g/L] DER BASENKATALYSIERTEN VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT 5 % NH₃ BEI VERSCHIEDENEN ZEITEN UND TEMPERATUREN (T: TEMPERATUR, t: ZEIT, n.d.: < NACHWEISGRENZE; ANALYSIERTE PARAMETER SIEHE TABELLE 4-11)

T [°C]	t [min]	Acetat [g/L]	Hydroxyaceton [g/L]	Furfural [g/L]	HMF [g/L]
21°C	5	3,83	n.d.	n.d.	n.d.
	10	3,89	n.d.	n.d.	n.d.
	30	3,42	n.d.	n.d.	n.d.
	60	4,16	n.d.	n.d.	n.d.
125°C	5	4,28	0,13	n.d.	n.d.
	10	4,55	0,18	n.d.	n.d.
	30	4,43	0,25	n.d.	n.d.
	60	4,12	0,32	0,01	n.d.
150°C	5	4,25	0,47	0,01	0,01
	10	5,04	0,58	0,01	0,01

Auffällig bei der Vorbehandlung sind jedoch die hohen Verzuckerungsgrade bei Raumtemperatur. Sie erreichen fast den optimierten Verzuckerungsgrad bei 125 °C und 5 min. In der Literatur werden ebenfalls Vorbehandlungen bei niedrigen Temperaturen durchgeführt, in der Regel bei Mais, um die Cellulose aufquellen zu lassen und so die enzymatische Hydrolyse zu verbessern. (Saha and Cotta 2006, Govumoni, Koti et al. 2013, Sun, Duan et al. 2015) Die Abbildung 5-5 zeigt die Veränderung von gemahlenem Kaff nach der Vorbehandlung mit Natronlauge für eine Stunde bei Raumtemperatur. Das Kaff ist aufgequollen und weist nur noch wenig „strohige bzw. faserige“ Komponenten auf. Dies verdeutlicht welches Potential diese Variante der Vorbehandlung hat.

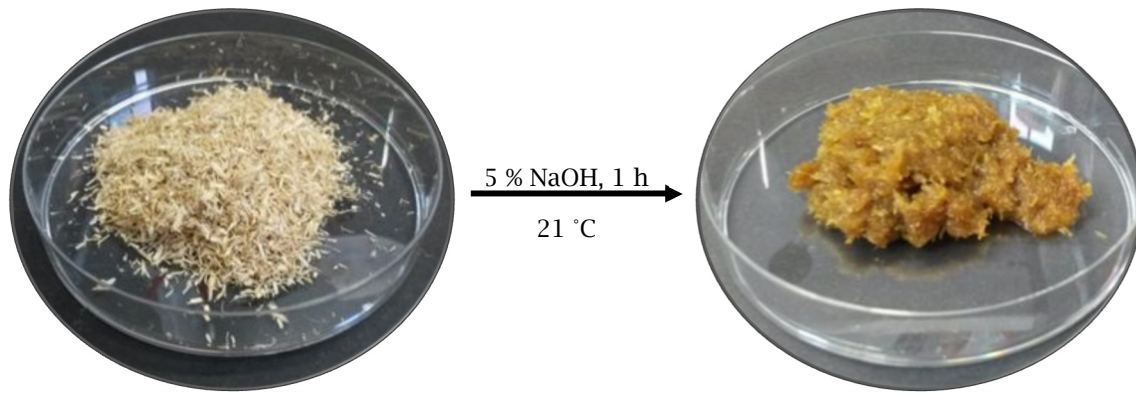


ABBILDUNG 5-5 WIRKUNG VON 5 % NATRONLAUGE AUF GEMAHLENES KAFF NACH 1 h UND RAUMTEMPERATUR, LINKES BILD: GEMAHLENES KAFF, RECHTES BILD: GEMAHLENES UND MIT NaOH VERSETZTES KAFF NACH 1 h

Um zu überprüfen, ob andere Laugen wie Lithiumhydroxid, Kaliumhydroxid und Calciumhydroxid ähnliche Eigenschaften aufweisen und ggf. bessere Alternativen darstellen, wurden von allen Laugen eine 1,25 molare Lösung (bei NaOH entspricht dies einer 5 %igen (w/w) Lösung) hergestellt und ebenfalls mit Kaff versetzt und anschließend unter Standardbedingungen enzymatisch hydrolysiert (siehe Abbildung 5-6).

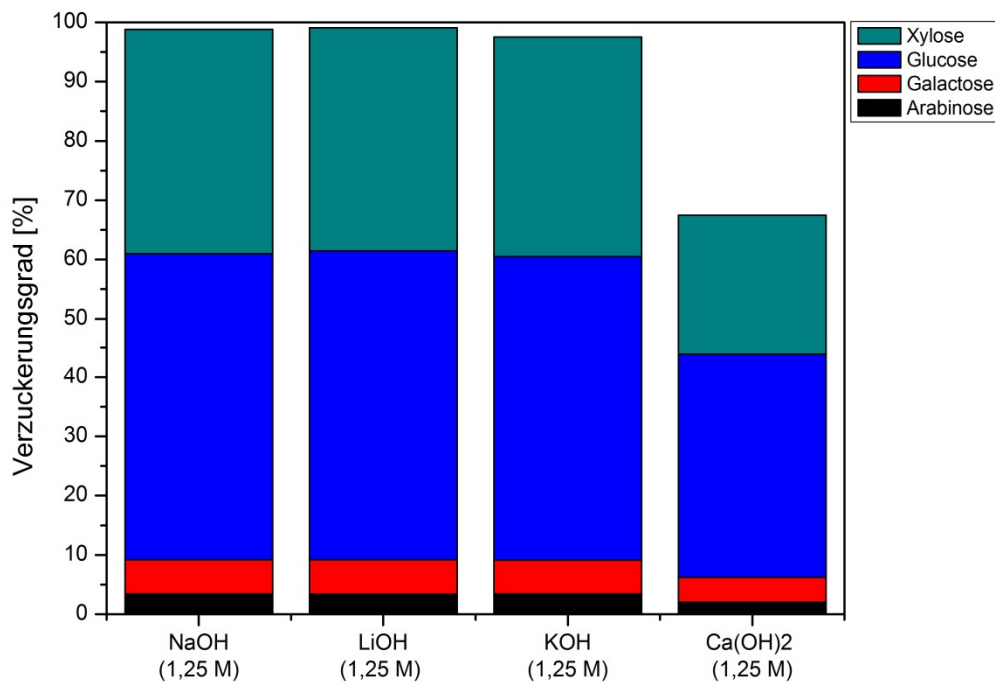


ABBILDUNG 5-6 VERGLEICH DER VORBEHANDLUNG VON KAFF MIT NaOH, LiOH, KOH, Ca(OH)₂ (JE 1,25 M) FÜR 24 h BEI 21 °C MIT ANSCHLIEßENDER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h)

Der Vergleich der Basen zeigt, dass die starken Basen (NaOH (pK_b : -0,56), LiOH (pK_b : 0,18) und KOH (pK_b : -1,1)) keine signifikanten Unterschiede untereinander aufweisen und je einen Verzuckerungsgrad von ~ 99 % aufweisen. Die schwache Base (Ca(OH)₂ (pK_{b1} : 1,37, pK_{b2} : 2,43)) hingegen kann unter den, im Vergleich milden Bedingungen, das Kaff nicht genügend vorbehandeln und keine effektive Hydrolyse gewährleisten. Diese Variante weist einen Verzuckerungsgrad von nur 67 % auf. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den starken Basen erkennbar sind, wird die Vorbehandlung mit Natronlauge durchgeführt, da diese die kostengünstigste Lauge ist. Im Anschluss an die Auswahl der Basen wird die Konzentration der Natronlauge optimiert (Abbildung 5-7), da diese mit der Einwirkzeit und der Feststoffkonzentration die Parameter sind, die den größten Einfluss auf die Vorbehandlung haben.

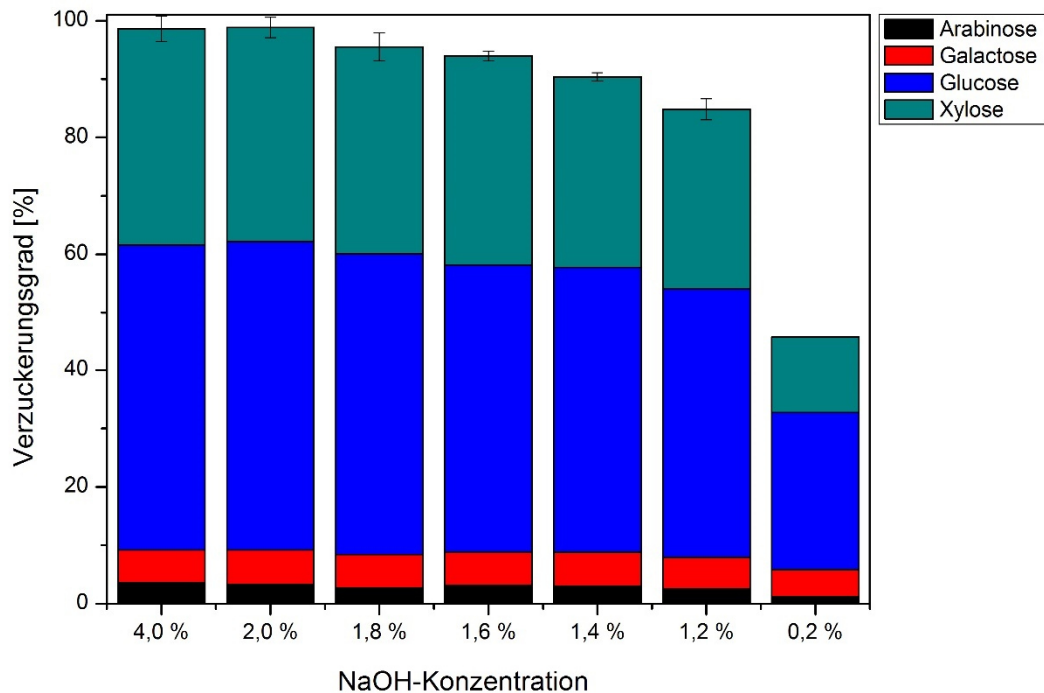


ABBILDUNG 5-7 OPTIMIERUNG DER NaOH-KONZENTRATION WÄHREND DER KAFF-VORBEHANDLUNG BEI 10 % FESTSTOFFANTEIL UND 21 °C FÜR 24 h MIT ANSCHLIEßENDER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h)

Der Verzuckerungsgrad hängt, wie zu erwarten, stark von der Konzentration der eingesetzten Lauge ab. So erreichen die Laugen bei 4,0 und 2,0 wt. % einen DOS von je 99 % während die 1,8 %ige NaOH einen DOS von nur noch 95 % erreicht. Je niedriger die NaOH-Konzentration wird, desto geringer wird der Verzuckerungsgrad. So kann mit einer 0,2 %igen NaOH ein Verzuckerungsgrad von nur noch 45 % erzielt werden.

Nach der Optimierung der NaOH-Konzentration, wurde die Vorbehandlungsdauer in Abbildung 5-8 mit der 2 %igen Natronlauge optimiert.

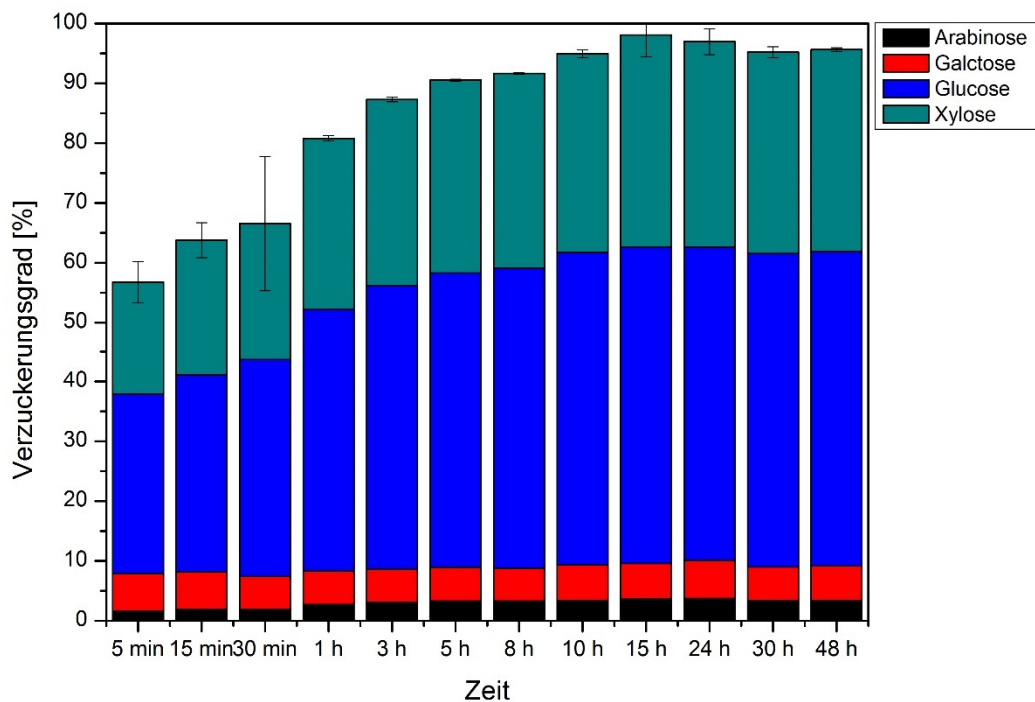


ABBILDUNG 5-8 OPTIMIERUNG DER 2 %IGEN NaOH-EINWIRKZEIT WÄHREND DER KAFF-VORBEHANDLUNG BEI 10 % FESTSTOFFANTEIL UND 21 °C MIT ANSCHLIEßENDER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE (5 % FESTSTOFFANTEIL, pH 4,8, 100 FPU, 50 °C, 600 RPM, 96 h)

Der zeitliche Einfluss ist klar zu erkennen, da bei einer Vorbehandlungszeit von 5 min ein Verzuckerungsgrad von nur 56 % erzielt werden kann. Dieser steigt mit ansteigender Reaktionszeit und erreicht ein Maximum nach 10 – 15 Stunden. Der Verzuckerungsgrad beträgt bei 15 h 99 %. Ein signifikanter Unterschied ist ab dieser Dauer nicht mehr festzustellen. Somit beträgt die Mindestdauer 15 h. Als einziges Abbauprodukt während der NaOH-Vorbehandlung bei Raumtemperatur entsteht Acetat, dass mit ~4 g/L vorhanden ist. Weitere Degradationsprodukte werden durch die milden thermischen Bedingungen nicht gebildet. Dies ist im Vergleich zu den bereits optimierten Vorbehandlungen ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal. Die optimierte NaOH-Vorbehandlung (DOS: 99 %) ist somit bei Raumtemperatur (21 °C), einer Konzentration von 2 wt.% und einer Reaktionszeit von min. 15 h.

In der Literatur werden verschiedene NaOH-Konzentrationen (0,5 – 8 % verwendet, um Biomassen wie Weizen- und Reisstroh sowie Holz vorzubehandeln. (Zhao, Wang et al. 2008, Cheng, Zheng et al. 2010, Govumoni, Koti et al. 2013, McIntosh, Zhang et al. 2016, Noori and Karimi 2016, Yu, Li et al. 2016) Govumoni et al. nutzt eine 1,5 %ige NaOH um Weizenstroh über Nacht vorzubehandeln und erzielt einen Verzuckerungsgrad von 49 % mit dieser Methode. (Govumoni, Koti et al. 2013) Cheng

et al. behandelten Reisstroh mit einer 2 %igen NaOH bei 21 °C für 3 h und erzielt einen Verzuckerungsgrad nach anschließender enzymatischen Hydrolyse von 65 % (Cheng, Zheng et al. 2010). Im Unterschied zu den beiden Literaturstellen wurde das in dieser Arbeit verwendete Kaff vermahlen, was Govumoni und Cheng nicht taten. Sun et al. 2015 (Sun, Peng et al. 2015) erzielen mit einer 7 %igen NaOH und einer HCl-katalysierten Mikrowellenhydrolyse einen Verzuckerungsgrad von 94 %, was vergleichbare Ergebnisse für Stroh trotz unterschiedlicher Hydrolysevarianten generiert. Allerdings werden bei dieser mikrowellenunterstützten Hydrolyse keine Degradationsprodukte betrachtet, was für diese Arbeit einen wesentlichen Aspekt darstellt.

5.4.4. ZUSAMMENFASSUNG

Es konnte für Weizenkaff im Sauren, Neutralen und Basischen je eine Vorbehandlungsmethode so optimiert werden, dass Verzuckerungsgrade zwischen 93 und 99 % mittels enzymatischer Hydrolyse erzielt werden konnten. Der Hauptunterschied dieser Methoden liegt in der Bildung von Zuckerdegradationsprodukten (siehe Abbildung 5-9).

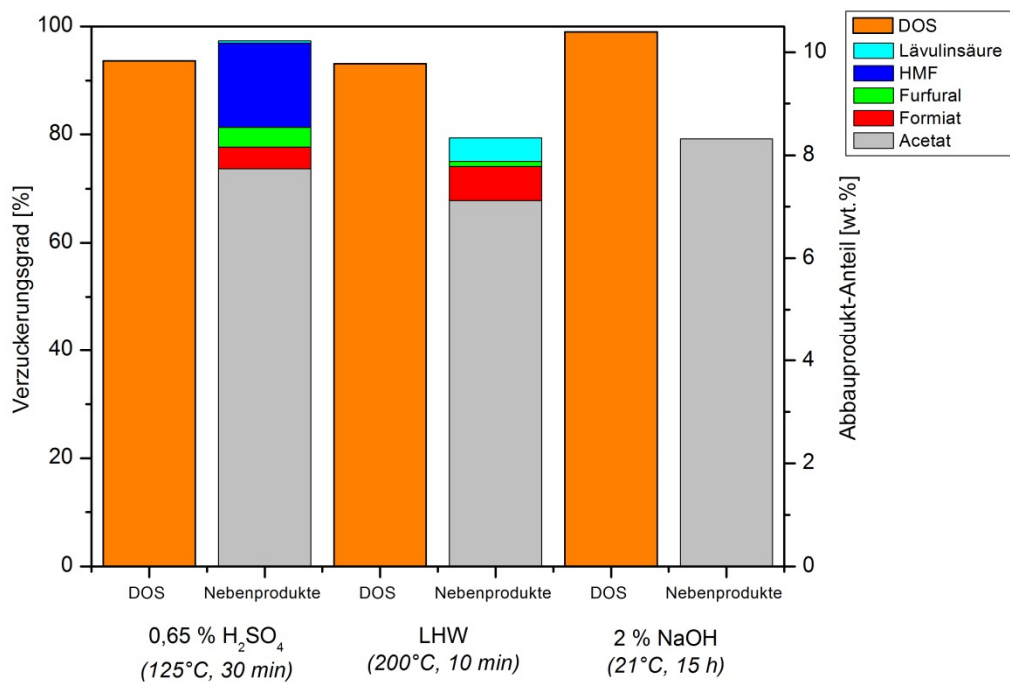


ABBILDUNG 5-9 VERZUCKERUNGSGRAD (DOS [%]) UND ANTEIL DER GEBILDETEN ABBAUPRODUKTE [%] DER OPTIMIERTEN VORBEHANDLUNGSMETHODEN FÜR WEIZENKAFF

Welche optimierte Methode großtechnisch zum Einsatz kommen könnte, hängt von den anschließenden Downstream Prozessen und Kosten ab. Diese müssen jedoch für jede biotechnologische und chemische Konversion einzeln betrachtet und kalkuliert werden, da die Hemmstoffkonzentration auf jeden Organismus unterschiedlich wirken kann. Des Weiteren sind die Aufarbeitungskosten für Säure/Basen Rückgewinnung und die damit verbundenen Entsalzungen zu berücksichtigen.

Nach den gesetzten Zielen aus Kapitel 2, ist eine Vorbehandlungsmethode mit einem maximalem Verzuckerungsgrad und einer minimalen Bildung von Degradationsprodukten zu entwickeln. Diese Kriterien erfüllt die Vorbehandlung mit 2 %iger NaOH bei Raumtemperatur, da diese einen Verzuckerungsgrad von 99 % aufweist und außer dem Acetat keine Degradationsprodukte entstehen lässt.

5.5. BILANZEN DER BESTEN VORBEHANDLUNGEN

Nachdem die besten Vorbehandlungsmethoden im Sauren, Neutralen und Basischen bestimmt werden konnten, werden diese noch bilanziert, um Verluste hinsichtlich der wertgebenden Komponenten zu verdeutlichen. Die Bilanz umfasst alle Vorbehandlungs-, Separations- und Hydrolyseschritte um den Gesamtprozess besser bewerten zu können. Für die Bilanzen wurden 10 g Kaff eingesetzt, die nach dem analytischen Säureaufschluss nach Sluiter 6,2 g Zucker und 1,9 g Lignin beinhalten. In Abbildung 5-10 ist die säurekatalysierte Vorbehandlung mit 0,65 % Schwefelsäure bei 125 °C und 30 min abgebildet. Im ersten Schritt, der mechanischen Zerkleinerung, ist kein Verlust an Zuckern oder Lignin festzustellen. Diese Feststellung lässt sich auch auf die neutrale und basenkatalysierte Vorbehandlung übertragen. Nach der mechanischen Vorbehandlung folgt die thermochemische Vorbehandlung mittels Schwefelsäure und anschließender Separation des Probengemisches mittels Filtration. Im Filtrat verbleibt der Kaff-Extrakt, der 0,1 g Zucker, 0,3 g Zucker-Abbauprodukte und 1,0 g Lignin enthält. Das entspricht einem Verlust von 1,6 % des verfügbaren Zuckers, 4,8 % des Zuckers werden in Degradationsprodukte umgesetzt und 52,6 % des Lignins werden aus der Matrix herausgelöst. Im Filtrerrückstand verbleiben 95 % des verfügbaren Zuckers sowie 42 % des Lignins. Durch die Filtration verbleiben 5,4 % des Lignins und 1,2 % des verfügbaren Zuckers im Filter und werden dem Gesamtprozess entzogen.

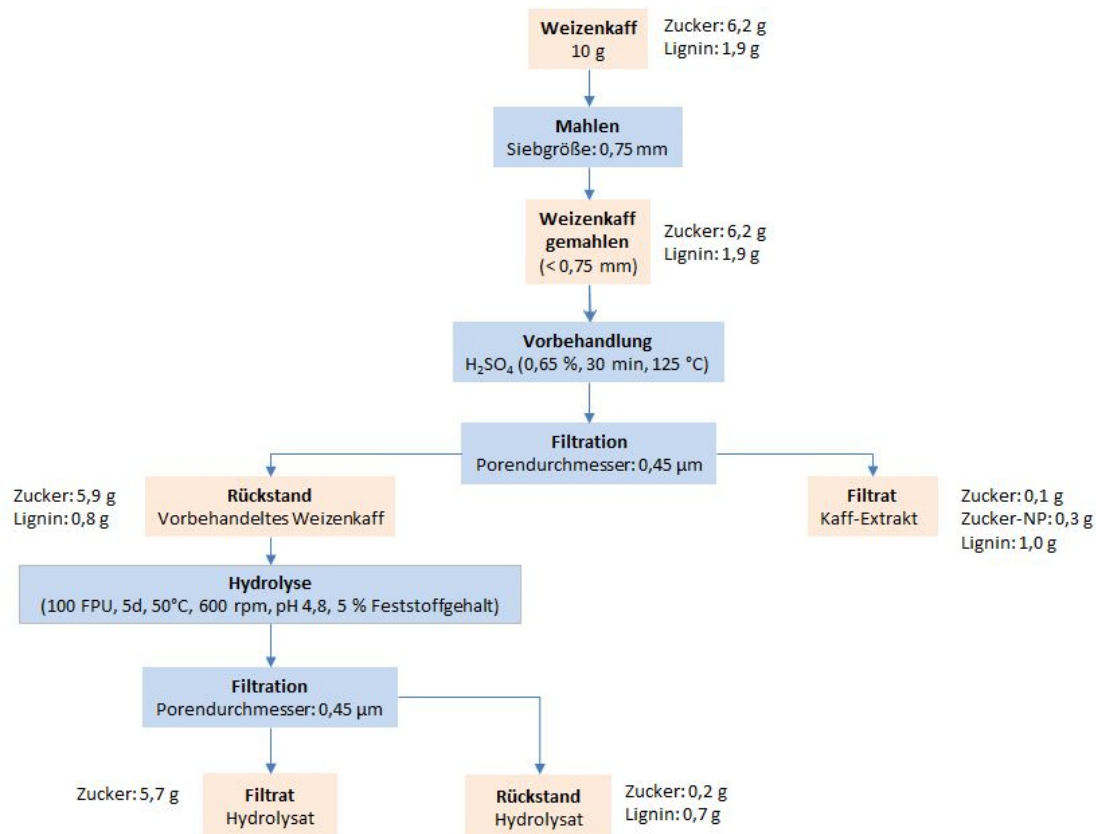


ABBILDUNG 5-10 ZUCKER- UND LIGNINBILANZ DER H₂SO₄- WEIZENKAFFVORBEHANDLUNG UND ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE

Nachdem der Rückstand hydrolysiert wurde, wurde das Hydrolysat erneut filtriert, um das Hydrolysat von den verbleibenden Rückständen zu trennen. Im Filtrat bzw. Hydrolysat sind 5,7 g bzw. 93 % des Zuckers zu detektieren und im Filtrerrückstand verbleiben 0,2 g bzw. 3,2 % des verfügbaren Zuckers sowie 36,8 % des Lignins.

Die Bilanz der Vorbehandlung im Neutralen mittels LHW ist in Abbildung 5-11 dargestellt und beginnt ebenfalls mit 10 g Kaff bzw. 6,2 g verwertbaren Zucker. Nach der Vorbehandlung können im Kaff-Extrakt 3,2 % (0,2 g) des Zuckers sowie 3,2 % Zuckerdegradationsprodukte und 42,1 % des Lignins quantifiziert werden. Im Filtrerrückstand, der im Anschluss hydrolysiert wird, sind 95,1 % des verwertbaren Zuckers und 47,3 % des Lignins enthalten. Durch die Filtration verbleiben erneut 5,2 % des Lignins und 1,6 % des Zuckers im Filter und werden dem Gesamtprozess entzogen. Im Hydrolysat können nach der Filtration 93 % des Zuckers analysiert werden. Im Filtrerrückstand verbleiben 4,8 % des Zuckers und 42,1 % des Lignins. Auch bei der letzten Filtration ist ein Verlust von 5 % des Lignins und 4 % des Zuckers zu verzeichnen.

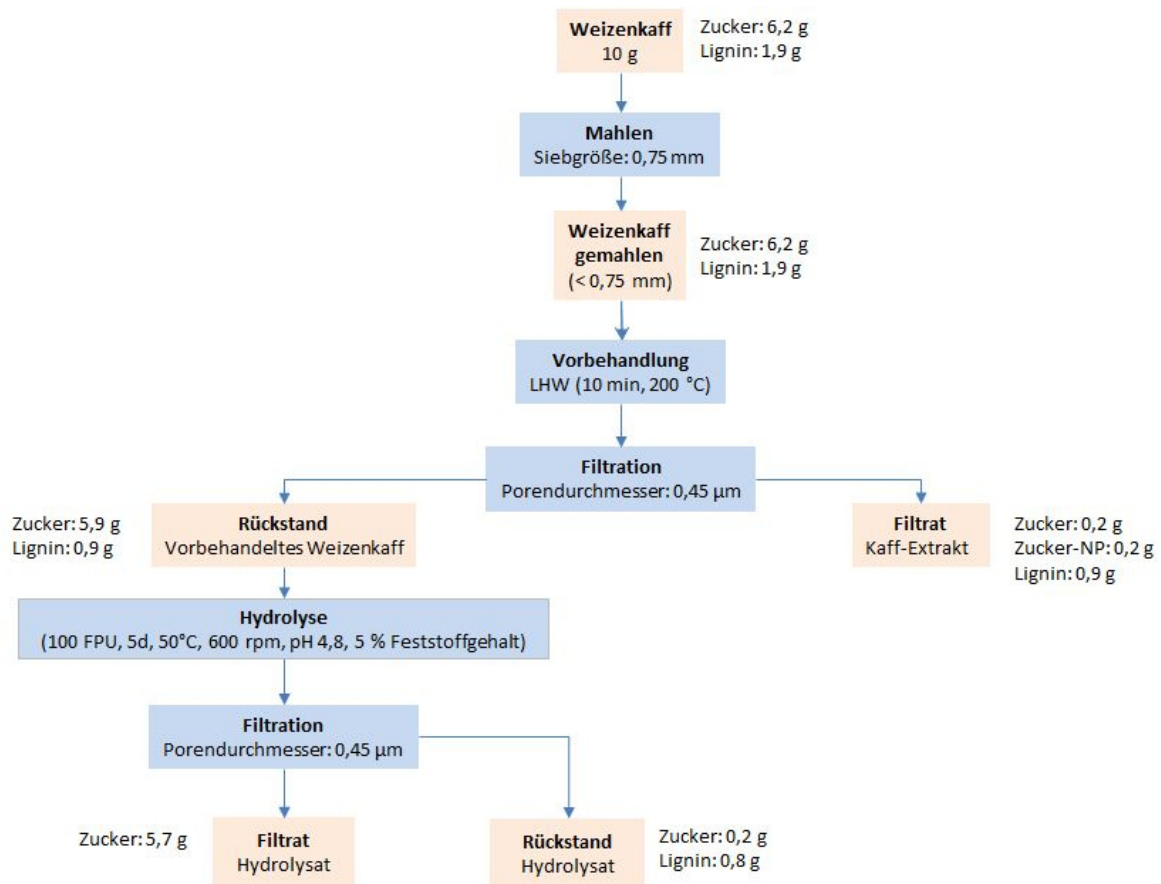


ABBILDUNG 5-11 ZUCKER- UND LIGNINBILANZ DER LHW- WEIZENKAFFVORBEHANDLUNG MIT ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE

Die dritte bilanzierte Vorbehandlung, die NaOH-basenkatalysierte Vorbehandlung, ist in Abbildung 5-12 dargestellt. Nach der mechanischen und chemischen Vorbehandlung verbleiben im Kaff-Extrakt 1,6 % (0,1 g) des Zuckers und 52,6 % des Lignins. Im Filterrückstand können durch diese Vorbehandlung 98,6 % des verfügbaren Zuckers und 47,3 % des Lignins detektiert werden.

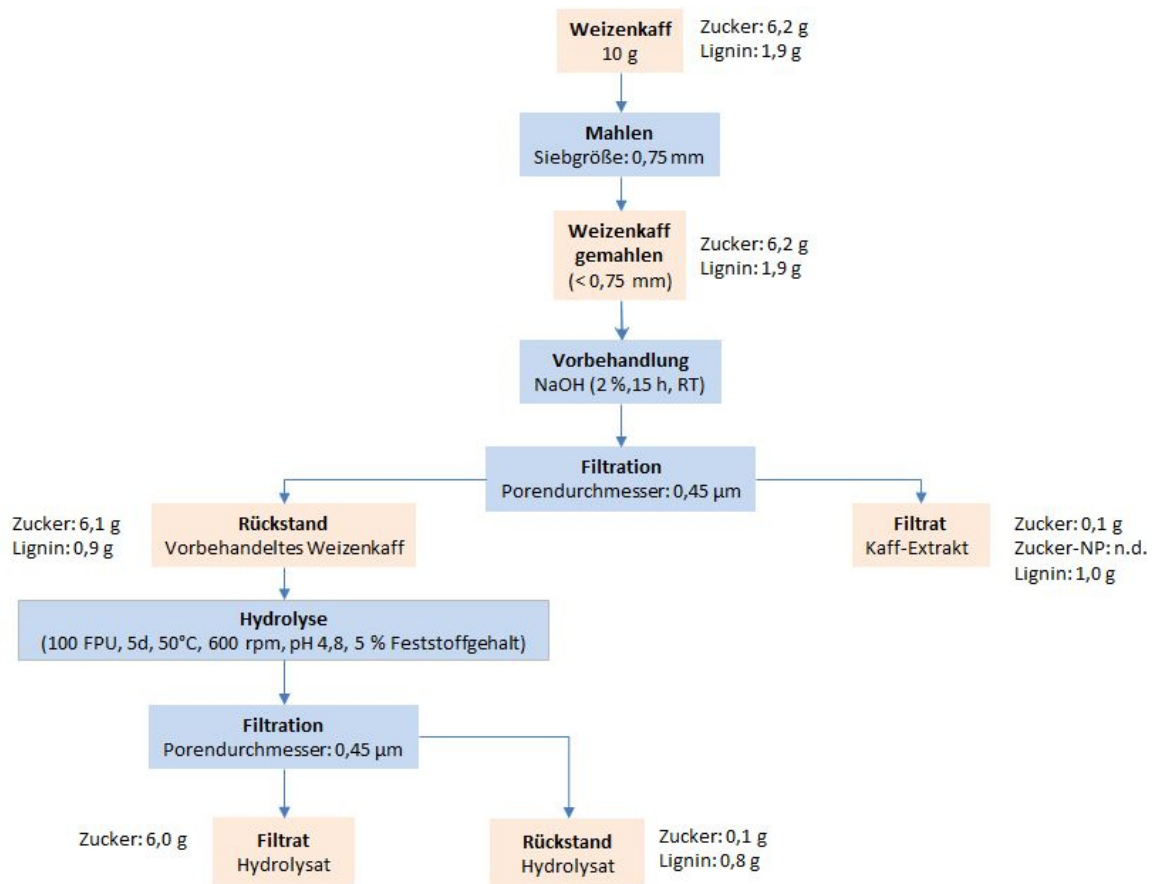


ABBILDUNG 5-12 ZUCKER- UND LIGNINBILANZ DER NaOH-WEIZENKAFFKAFFVORBEHANDLUNG MIT ANSCHLIEßENDER, ENZYMATISCHEN HYDROLYSE

Im Anschluss an die Hydrolyse wird die Probe ebenfalls filtriert. Im Filtrat/Hydrolysat verbleiben 98,5 % des verfügbaren Zuckers, was im Vergleich zu der neutralen und säurekatalysierten Hydrolyse 5,5 % mehr Zucker im Hydrolysat bedeutet. Im Filtrerrückstand verbleiben 1,6 % des Zuckers und 42,1 % des Lignins. Während der Filtrationsschritte verbleiben auch bei der NaOH Vorbehandlung ca. 5 % des Lignins im Filter, jedoch ist kein Verlust an Zuckern festzustellen. Dadurch, dass die basenkatalysierte Vorbehandlung keine hydrolytischen Eigenschaften aufweist und die Cellulosefasern aufquellen, verbleiben diese auf dem Filter und interagieren nicht mit dem Nylon Filtermaterial.

5.5.1. ZUSAMMENFASSUNG

Im direkten Vergleich der drei Bilanzen zeigen die neutrale und die säurekatalysierte Vorbehandlung keine signifikanten Unterschiede (je 5,7 g Zucker im Hydrolysat und 0,2 bzw. 0,3 g Nebenprodukte nach der Vorbehandlung im Filtrat). Die Fähigkeit den Lignocelluloseverbund zu lösen und das Lignin z.T. in Lösung zu bringen ist auch bei der basenkatalysierten Vorbehandlung der Fall. Hier können 6,0 g Zucker im Hydrolysat nachgewiesen werden und es können auch im 10 g Ansatz keine Zucker-Nebenprodukte nachgewiesen werden. Hinsichtlich der analysierten Parameter dieser Bilanz (Zucker, Lignin, Nebenprodukte) kann das Verfahren mit der Vorbehandlung durch Natronlauge einen signifikanten Unterschied im Bereich des Verzuckerungsgrades aufweisen. So kann hier ein um 5,5 % höherer Verzuckerungsgrad im Vergleich zu den anderen Verfahren festgestellt werden. Es werden also weniger Polysaccharide während der Vorbehandlung umgesetzt oder gehen durch Trennverfahren verloren. Aspekte wie Chemikalien- und Energiekosten, die für eine umfassende Bilanz fehlen müsste durch ein Life-Cycle Assessment festgestellt werden.

Unter den gegebenen Daten und der gesetzten Zielsetzung dieser Arbeit ist die Vorbehandlung mit Natronlauge die effektivste der drei Varianten. Somit wird die anschließende Optimierung der enzymatischen Hydrolyse mit NaOH-vorbehandeltem Kaff durchgeführt.

5.6. OPTIMIERUNG DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE

Nachdem das Kaff optimal vorbehandelt werden kann, muss im nächsten Schritt die enzymatische Hydrolyse optimiert werden. Eine säurekatalysierte Vorbehandlung wird aufgrund der Bildung von Zuckerdegradationsprodukten (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Rasmussen, Sørensen et al. 2014) nicht in Betracht gezogen. Für eine effiziente enzymatische Hydrolyse müssen die Faktoren mit dem größten Einfluss optimiert werden. Zu diesen Faktoren zählen die Hydrolysedauer, der verwendete Feststoffgehalt, das Mischungssystem, der Einfluss der Enzymmenge sowie der mögliche Einfluss von Degradationsprodukten aus der thermochemischen Vorbehandlung.

5.6.1. BESTIMMUNG DER ENZYM-AKTIVITÄTISOPTIMA VON BIOGAZYME 2X

Bevor die Optimierung der Kaffhydrolyse durchgeführt werden kann, müssen die optimalen Hydrolysebedingungen für das verwendete Biogazyme 2x bestimmt werden. Um die Enzymoptima bestimmen zu können, wurde die Cellulaseaktivität bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten durchgeführt. In Abbildung 5-13 ist der Verlauf der Cellulaseaktivität in Abhängigkeit der Temperatur (A) und des pH-Wertes (B) abgebildet. Die bestimmten Aktivitätsoptima liegen bei einer Temperatur von 50 °C und einem pH-Wert zwischen 4 - 5. Für alle Experimente wurde daher ein pH-Wert von 4,5 und die Temperatur von 50 °C eingestellt.

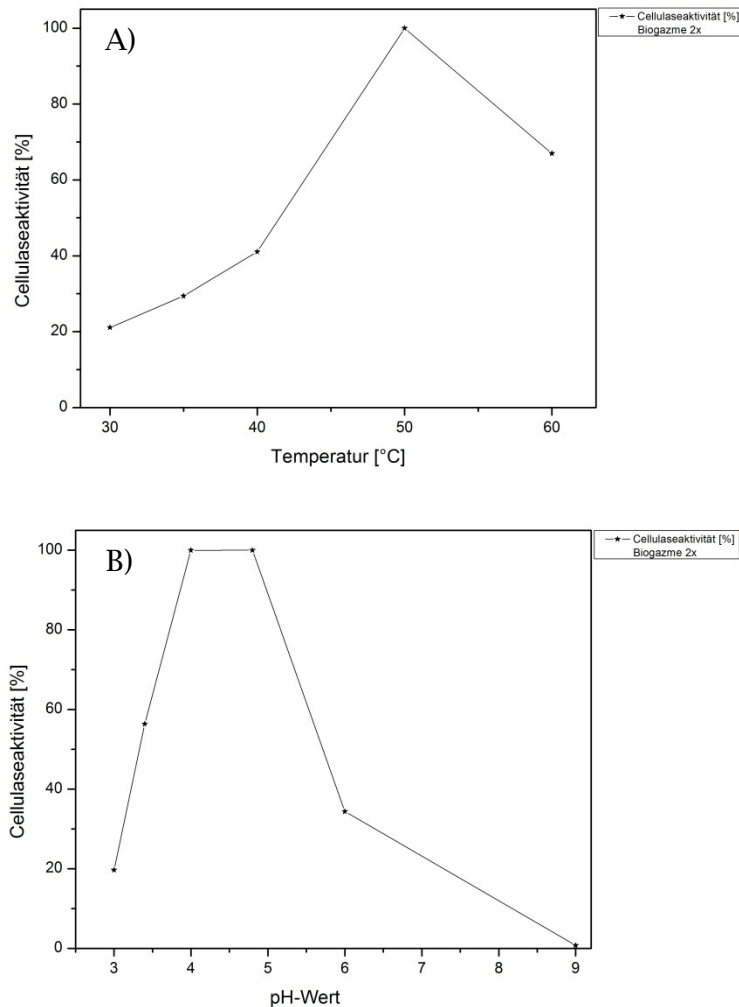


ABBILDUNG 5-13 HYDROLYSE-ZEIT-VERLAUF VON NaOH-VORBEHANDELTEM WEIZENKAFF IN ABHÄNGIGKEIT ZUM VERZUCKERUNGSGRAD (DOS) UND DER ZUCKERKONZENTRATION [G/L]. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2X, 100 FPU/G BIOMASSE, 5 % FESTSTOFFKONZENTRATION, pH 4,5 UND 50 °C IM THERMOSHAKER

5.6.2. HYDROLYSEDAUER

Im ersten Schritt der Optimierung wird die Dauer der Kaffhydrolyse bestimmt. Je schneller der Prozess abgeschlossen ist, desto eher kann das Hydrolysat in der chemischen oder biotechnologischen Konversion eingesetzt werden. Des Weiteren erhöht sich bei längerer Reaktionszeit die Gefahr der Kontamination mit Fremdorganismen, die die hydrolysierten Zucker abbauen und unerwünschte Nebenprodukte generieren. In Abbildung 5-14 ist der Hydrolyse-Zeit- Verlauf von NaOH vorbehandeltem Kaff in Abhängigkeit zu dem Verzuckerungsgrad sowie zur Gesamtzuckerkonzentration abgebildet.

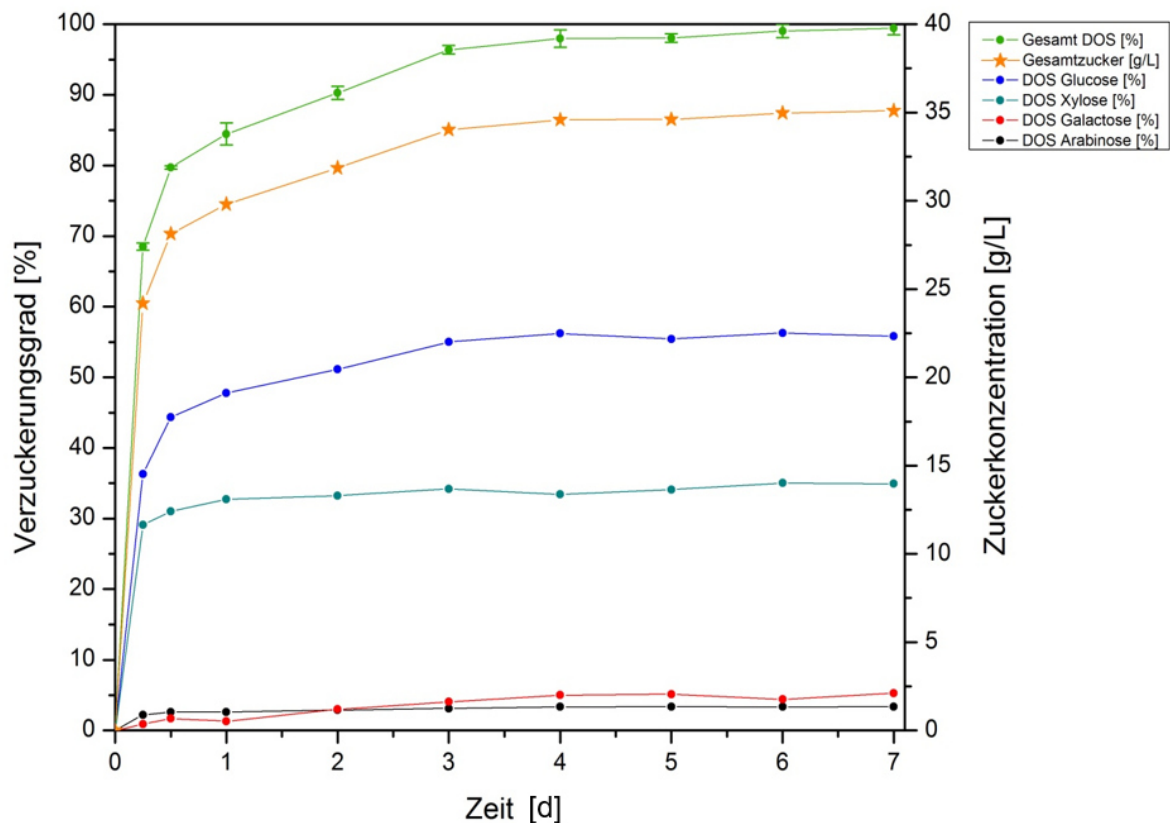


ABBILDUNG 5-14 VERLAUF DES VERZUCKERUNGSGRADES [%] WÄHREND EINER HYDROLYSE SOWIE DER ANSTIEG DER GESAMTZUCKERKONZENTRATION [G/L] BEI DER HYDROLYSE VON NaOH VORBEHANDELTEM WEIZENKAFF BEI EINE FESTSTOFFKONZENTRATION VON 5 %, 100 FPU/G BIOMASSE BEI 50 °C UND EINEM pH VON 4,5 IM THERMOSHAKER

Zu erkennen ist, dass die Hydrolyse innerhalb der ersten 6 h schnell beginnt und bis nach 12 h der Großteil der hydrolysierten Zuckermomere vorliegt. Zwischen 12 und 24 h beginnt die Hydrolyse der Kohlenhydratpolymere langsamer zu werden bis sich nach ca. 96 h ein Plateau beim maximalen Verzuckerungsgrad gebildet hat. Da für das Biogazym 2x ein steigender Verzuckerungsgrad bis zu diesen 96 h zu verzeichnen ist, wird diese Reaktionsdauer als Standardzeit für die Hydrolysen verwendet. In der Literatur werden für andere, kommerziell erhältliche Enzymmischungen ganz unterschiedliche Reaktionszeiten von 48, 72, 96 oder 120 h angegeben. Die kurze Hydrolysezeit von 48 h wird jedoch meist verwendet, um Tendenzen der Hydrolyse zu erkennen, die langen Reaktionszeiten von 96 oder 120 h werden genutzt, um eine maximale Zuckerkonzentration zu erhalten. Durch diese Erkenntnisse kann der Verlauf und die Reaktionszeit der kommerziellen Enzymmischungen mit dem

verwendeten Biogazym verglichen werden. (Philippidis, Smith et al. 1993, Wang, Keshwani et al. 2010, Xu, Cheng et al. 2010, Xu, Cheng et al. 2010, Govumoni, Koti et al. 2013, Ertas, Han et al. 2014)

5.6.3. EINGESETZTE ENZYMMENGE

Kommerziell erhältliche Enzymmischungen sind durch ihre hohen Anschaffungskosten ein signifikanter Kostenpunkt bei der Hydrolyse und somit im gesamten Prozess von nachwachsenden Rohstoffen. Aus diesem Grund muss versucht werden, eine möglichst geringe Menge an Enzym einzusetzen, um eine möglichst hohe Zuckerendkonzentration und einen hohen Verzuckerungsgrad zu erreichen. In Abbildung 5-15 ist der Verzuckerungsgrad in Abhängigkeit zurzeit von verschiedenen Cellulaseaktivitäten abgebildet. Es ist zu erkennen, dass der generelle Verlauf der Hydrolyse bei allen Enzymkonzentrationen vergleichbar ist: Die eingesetzten 200 und 100 FPU Biogazyme 2x/g Biomasse erzielen jedoch als einzige einen Verzuckerungsgrad von knapp 100 % bei einer Feststoffkonzentration von 5 %. Signifikante Unterschiede in Bezug zur Hydrolysegeschwindigkeit sind dabei nicht zu erkennen. Bei einem Enzymeinsatz von nur 50 FPU/g Biomasse kann ein Verzuckerungsgrad von knapp 90 % erzielt werden. Signifikant geringere Verzuckerungsgrade von etwa 70 % können mit 10 – 20 FPU/g Biomasse erreicht werden, wobei sich diese Enzymkonzentration untereinander kaum unterscheiden. Mit einem Enzymeinsatz von 5 FPU/g Biomasse können nur 50 % des möglichen Zuckers hydrolysiert werden. Der Verlauf der enzymatischen Hydrolyse kann durch Sattler und Esterbauer für die enzymatische Hydrolyse von Sägemehl bestätigt werden, wobei diese im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede im Bereich von 100 bis 37,5 FPU aufzeigen können. (Sattler, Esterbauer et al. 1989)

In der Literatur werden üblicherweise Enzymkonzentrationen zwischen 10 – 20 FPU eingesetzt, da durch die hohen Anschaffungskosten ein Kompromiss zwischen diesen Kosten und der Zuckerendkonzentration gefunden werden muss. (Martín, Rocha et al. 2012, Coimbra, Duque et al. 2016, Fockink, Urio et al. 2017) Das verwendete Enzyme Biogazyme 2x kostet bereits bei einer Enzymmenge von 20 FPU/g pro kg Weizenkaff 0,10 € (Preis lt. Hersteller für technischen Maßstab, Juni 2016). Zum Vergleich würde in der Studie nach Tusé et al. (Tuse, Tu et al. 2014) das Enzym 0,35 €/kg Weizenkaff kosten. Dies verdeutlicht, welchen großen Kostenfaktor das Enzym darstellt und das versucht werden muss, mit einer geringen Enzymmenge hohe Verzuckerungsgrade zu generieren.

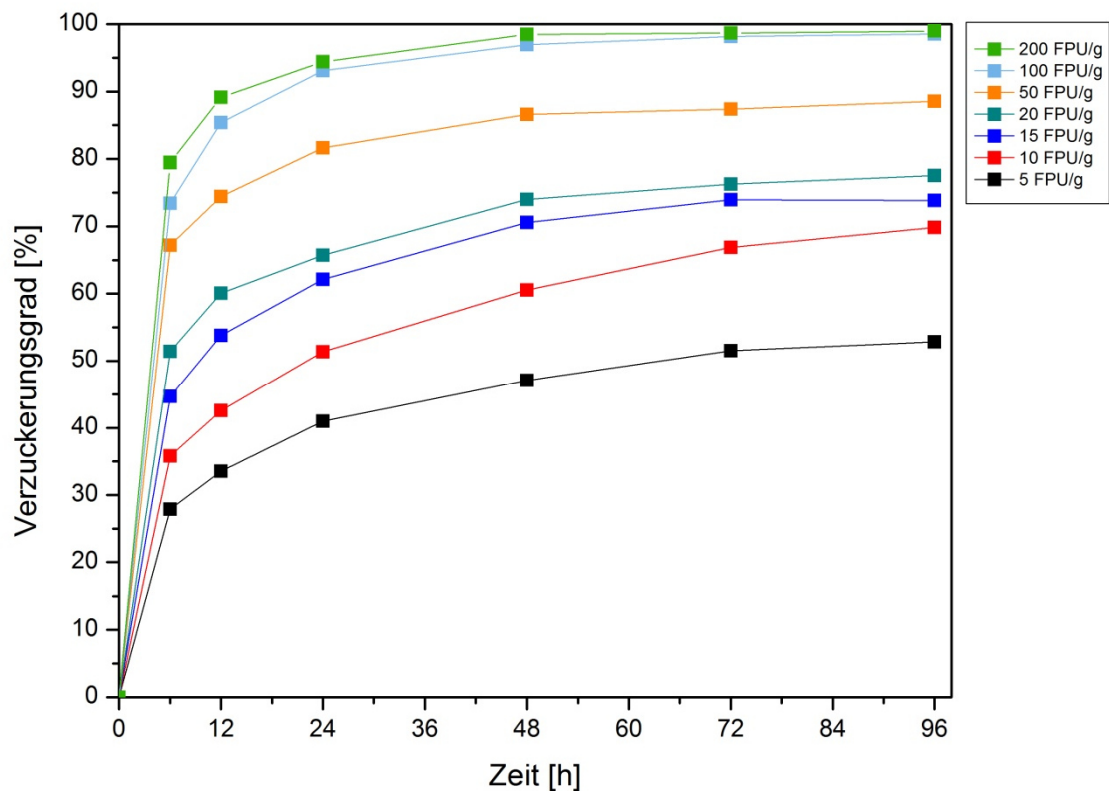


ABBILDUNG 5-15 HYDROLYSEVERLAUF VON KAFF MIT VERSCHIEDENEN CELLULASEAKTIVITÄTEN [5 – 200 FPU/G BIOMASSE] IN ABHÄNGIGKEIT ZUM VERZUCKERUNGSGRAD. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2X, 5 % FESTSTOFFKONZENTRATION, pH 4,5 UND 50 °C IM THERMOSHAKER

Um eine effiziente enzymatische Hydrolyse zu etablieren, muss die verwendete Enzymmenge weiter optimiert werden, um die Kosten für das Enzym zu senken. Dazu müssen Einflussfaktoren untersucht werden, die eine Minderung der Enzymaktivität hervorrufen. Im ersten Schritt wurde dazu die Enzymaktivität über die Zeit einer möglichen Hydrolyse bestimmt (Abbildung 5-16). Die Cellulaseaktivität des Enzyms, die beim Beginn ermittelt wurde, stellt dabei die relative Cellulaseaktivität von 100 % dar.

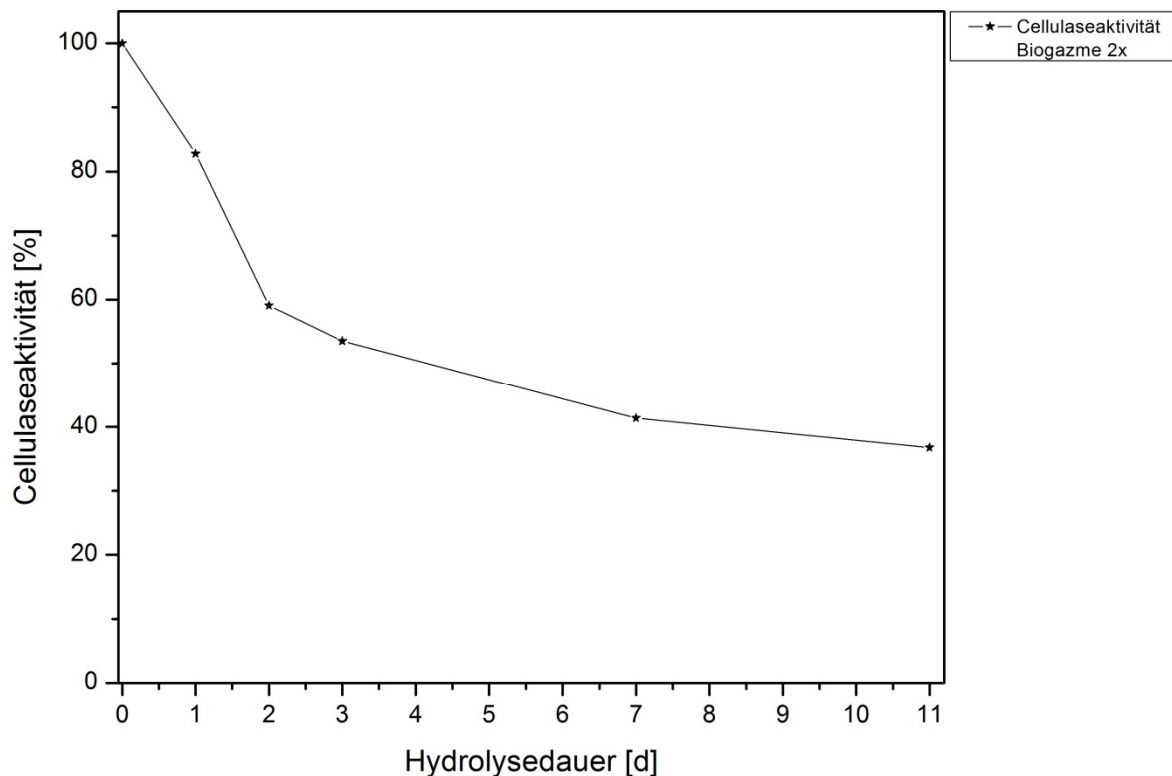


ABBILDUNG 5-16 CELLULASESTABILITÄT VON BIOGAZYME 2X IN ABHÄNGIGKEIT ZUR ZEIT VON KAFF. DAS ENZYM WURDE DABEI IN EINEM 0,01 M ACETATPUFFER (pH 4,5) BEI 50 °C IM VISCO-TESTER BEI 10 RPM GERÜHRT. DIE BESTIMMUNG DER CELLULASEAKTIVITÄT ERFOLGTE NACH GHOSE (GHOSE 1987)

Der Verlauf der Enzymaktivität zeigt, dass das Enzym innerhalb von 48 h auf 60 % der Cellulaseaktivität zurückfällt und im weiteren Verlauf sinkt die Aktivität auf 40 % der Anfangsaktivität. Auch Zarzar (Zarzar, Kalow et al. 2017) beschreibt, dass die Enzymaktivitäten innerhalb kurzer Zeit stark sinken. Die Hydrolysezeiten sollen daher so optimiert werden, dass der Aktivitätsverlust keinen signifikanten Einfluss mehr hat. Durch die Untersuchungen in Abbildung 5-15 kann gezeigt werden, dass ein Verzuckerungsgrad von nahezu 100 % mit einem Enzymeinsatz von 100 FPU/g innerhalb von 48 h erreicht werden kann. Ob dies unter wirtschaftlicher Betrachtung sinnvoll und rentabel ist, ist in Frage zu stellen und kann im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. In der Annahme, dass dieser Weg nicht gewinnbringend ist, muss ein neuer Ansatz gefunden werden, um den Enzymeinsatz weiter zu minimieren. Ein möglicher Ansatz dabei ist eine kontinuierliche oder partielle Enzymzugabe während der Hydrolyse. Durch dieses Verfahren würden immer Enzyme mit einer maximalen Enzymaktivität vorliegen. Dieser Ansatz wird in Kapitel 5.6.6 weiter diskutiert. Weitere Ansatzpunkte für die Optimierung können der Einfluss möglicher Nebenprodukte, die Feststoffkonzentration während der

Hydrolyse sowie die Vermischung des Hydrolysates sein. Daher werden diese Punkte in den folgenden Kapiteln weiter betrachtet.

5.6.4. EINFLUSS VON NEBENPRODUKTEN

Ein weiterer Einflussfaktor, der die enzymatische Hydrolyse negativ beeinflussen kann, ist das Vorhandensein von Degradationsprodukten aus der Vorbehandlung. Im Falle der Vorbehandlung mit Natronlauge bei 21 °C entsteht nur Acetat als Degradationsprodukt, doch bei der LHW oder der verdünnten Säure entstehen weitere Nebenprodukte, die nach Palmqvist auch eine anschließende Fermentation hemmen können. (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000, Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000). Daher wurde der Einfluss von potentiellen Degradationsprodukten auf Biogazyme 2x untersucht [Abbildung 5-17]. Um definierte Konzentrationen der möglichen Hemmstoffe einsetzen zu können, wurde als Biomasse ein Cellulose/Xylose Gemisch eingesetzt und mit typischen Degradationsprodukten (Vanillin, Ameisensäure, HMF, Furfural, Essigsäure sowie Lävulinsäure) der thermochemischen Vorbehandlung nach Rasmussen et al., Larsson et al und Klinke et al. (Larsson, Palmqvist et al. 1999, Klinke, Thomsen et al. 2004, Rasmussen, Sørensen et al. 2014) dotiert. Als weiterer Parameter wurde Ethanol getestet, da Ethanol von vielen Mikroorganismen gebildet werden kann, die während der Hydrolyse den Zucker verstoffwechseln können. Ethanol wäre als möglicher Hemmstoff auszuschließen, wenn im Vorfeld der Hydrolyse die Biomasse sterilisiert werden würde.

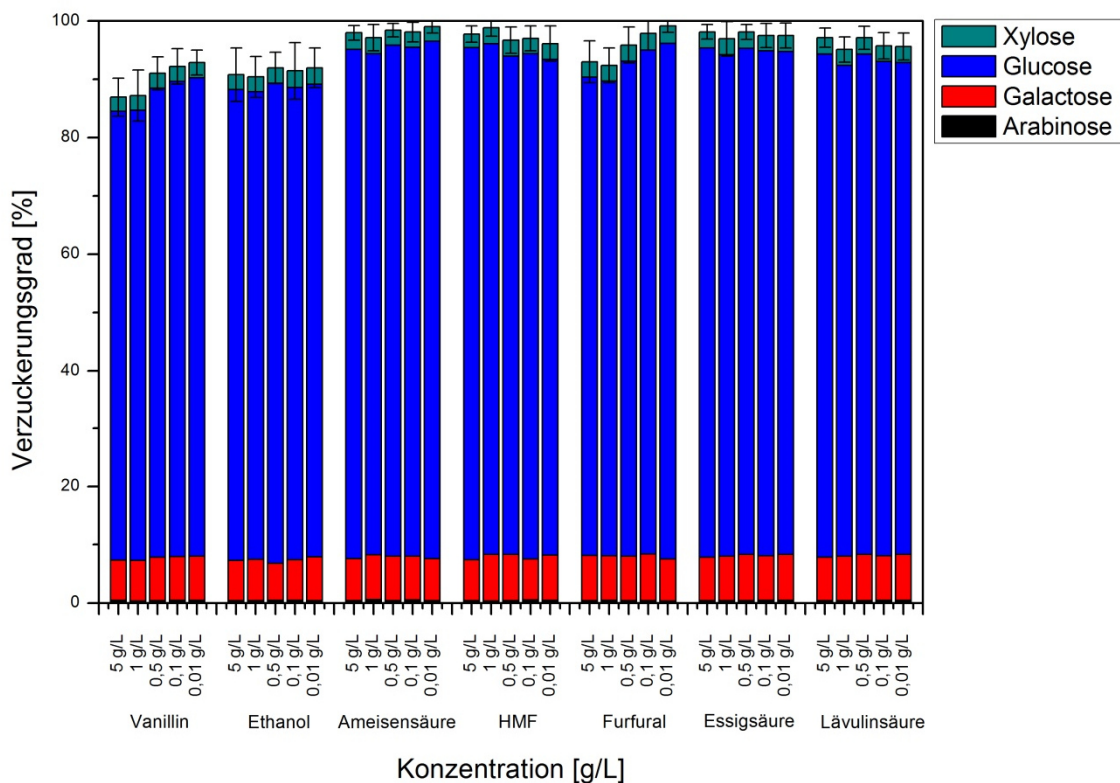


ABBILDUNG 5-17 EINFLUSS DER DEGRADATIONSPRODUKTE VANILLIN, ETHANOL, AMEISENSÄURE, HMF, FURFURAL, ESSIGSÄURE UND LÄVULINSÄURE AUF DEN VERZUCKERUNGSGRAD MITTELS ENZYMATISCHER HYDROLYSE VON CELLULOSE. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2X (20 FPU/G CELLULOSE), 5 % FESTSTOFFGEHALT, pH 4,5 UND 50 °C IM THERMOSHAKER

Es zeigt sich, dass die organischen Säuren keinen signifikanten Einfluss auf die Wirksamkeit des Enzyms bei der Hydrolyse zeigen. Das Aldehyd Vanillin zeigt mit Ethanol den größten, negativen Einfluss auf den Verzuckerungsgrad. So können schon bei einer Konzentration von 0,01 g/L Vanillin nur noch 93 % des möglichen Zuckers hydrolysiert werden. Auch das Ethanol senkt bereits ab einer Konzentration von 0,01 g/L den Verzuckerungsgrad auf ca. 90 %. Beide Produkte konnten bei den getesteten Vorbehandlungen nicht nachgewiesen werden. Furfural als weiteres Aldehyd senkt mit steigender Konzentration ebenfalls den Verzuckerungsgrad auf bis zu 92 % ab einer Konzentration von 1 g/L. Bei der Vorbehandlung mit verdünnter Schwefelsäure konnte eine maximale Konzentration von 2,4 g/L Furfural (bei 200 °C, 5 min) detektiert werden (siehe Tabelle 5-8), was somit eine Verminderung des Verzuckerungsgrades von ca. 10 % entspricht.

Unter den Bedingungen der optimierten Vorbehandlungen kann jedoch ein Einfluss von Degradationsprodukten auf die enzymatische Hydrolyse ausgeschlossen werden,

da die gebildeten Nebenprodukte nicht oder in zu geringen Konzentrationen vorliegen, um die Hydrolyse negativ zu beeinflussen.

5.6.5. EINFLUSS DES FESTSTOFFGEHALTES

Ein weiterer Parameter, der den Verzuckerungsgrad sowie die Gesamtzuckerkonzentration signifikant beeinflusst, ist die Wahl des Feststoffgehaltes während der enzymatischen Hydrolyse. Um diesen Parameter zu optimieren, wurden zwei unterschiedliche Hydrolysesysteme untersucht. Im Thermoshaker wurde die Biomasse während der Hydrolyse geschüttelt und im Rheometer wurde die Biomasse mittels Spindelrührer gerührt. In Abbildung 5-18 ist der Verzuckerungsgrad in Abhängigkeit zur Feststoffkonzentration der beiden Systeme aufgezeigt.

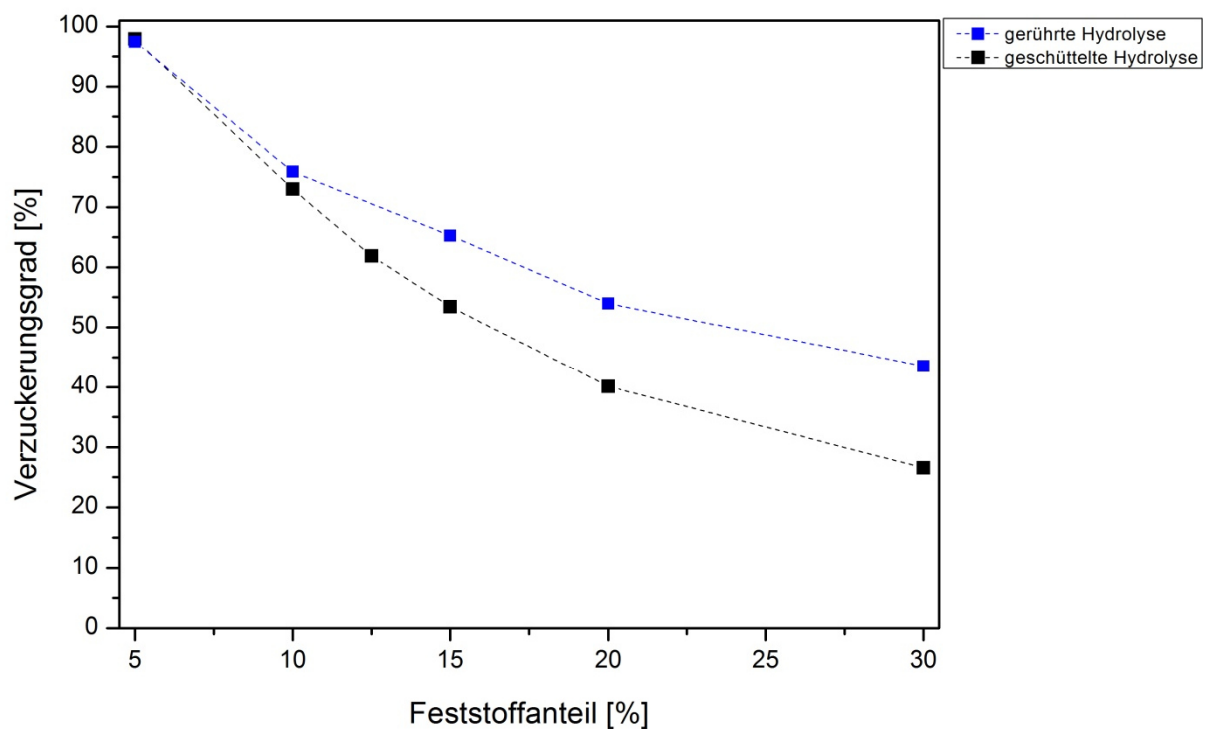


ABBILDUNG 5-18 VERGLEICH VON GESCHÜTTELTER UND GERÜHRTER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE VON KAFF BEI VARIIERENDER FESTSTOFFKONZENTRATION ZWISCHEN 5 UND 30 %. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2X (100 FPU/G CELLULOSE), pH 4,5 UND 50 °C IM VICO TESTER BEI 15 RPM

Es wird deutlich, dass mit steigendem Feststoffgehalt der Verzuckerungsgrad beider Hydrolysen signifikant sinkt. Der Unterschied der Systeme bei 5 oder 10 % Feststoffgehalt differiert nicht signifikant. Mit steigendem Feststoffgehalt sinkt nicht nur der Verzuckerungsgrad, sondern der Unterschied der beiden Systeme wird immer deutlicher. Bei einem Feststoffgehalt von 20 % erreicht die gerührte Hydrolyse noch 55 % des möglichen Verzuckerungsgrades während die geschüttelte Hydrolyse einen Verzuckerungsgrad von nur noch 40 % erzielt. Dieser Unterschied wird bei steigendem Feststoffgehalt noch deutlicher. Bei einem Feststoffgehalt von in der Literatur üblichen 10 - 20 % Feststoffgehalt kann mit dem gerührten System und 100 FPU/g Enzym eine Zuckerkonzentration von 55 g/L bei 10 % Feststoffgehalt bzw. 82 g/L bei 20 % Feststoffgehalt erzielt werden. Ziel muss es weiter sein, den Verzuckerungsgrad bei diesen Feststoffgehalten zu erhöhen.

5.6.6. OPTIMIERUNG DER GERÜHRTEN HYDROLYSE

Eine Möglichkeit, den Verzuckerungsgrad weiter zu erhöhen, ist dabei die Optimierung der Rührgeschwindigkeit. Dazu wurden Rührgeschwindigkeiten zwischen 5 und 500 rpm in Abhängigkeit zur Zuckerkonzentration in Abbildung 5-19 untersucht, da u.a. in den Untersuchungen von Fockink et al. gezeigt wird, dass limitierende Faktoren wie eine mangelnde Durchmischung zu Verlusten bei dem Verzuckerungsgrad führen (Fockink, Urio et al. 2017). Da mit steigender Rührgeschwindigkeit eine erhöhte Durchmischung generiert wird, sollte dies auch zu einem verbesserten Stofftransport zwischen Enzymen und Substrat führen. Daher wurde in der Untersuchungsserie mit den Rührgeschwindigkeiten zwischen 5 und 500 rpm mit einem Spindelrührer untersucht.

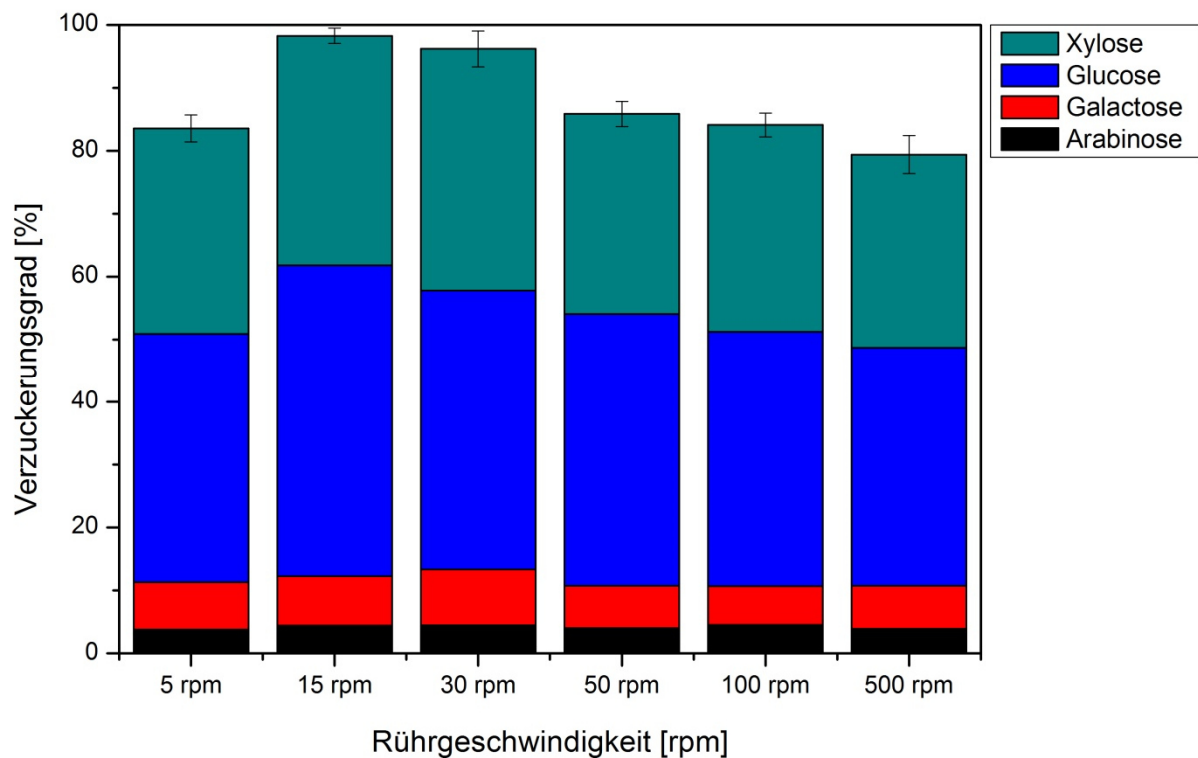


ABBILDUNG 5-19 OPTIMIERUNG DES VERZUCKERUNGSGRADES VON KAFF IN ABHÄNGIGKEIT ZUR RÜHRGESCHWINDIGKEIT BEI DER ENZYMATISCHEN HYDROLYSE IM VISCOTESTER MIT WENDELRÜHRER. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2x (100 FPU/G BIOMASSE), 5 % FESTSTOFFGEHALT, pH 4,5 UND 50 °C

Die Schlussfolgerungen und Annahmen aus den Ergebnissen von Fockink können mit den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bei einer hohen Durchmischung und einer somit hohen Rührgeschwindigkeit liegen auch hohe Scherkräfte in dem System vor. Ob die dadurch erhöhte Reibung die Enzyme sukzessiv deaktiviert, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden. Der höchste Verzuckerungsgrad liegt bei 15 rpm, wobei minimale Schwankungen keinen Einfluss haben. Wird die Rührgeschwindigkeit erhöht, könnte die Deaktivierung eintreten, sodass bei 50 rpm ein Defizit im Verzuckerungsgrad von 13 % gegenüber dem Verzuckerungsgrad bei 15 rpm vorliegt. Eine zu geringe Durchmischung senkt jedoch ebenfalls die maximal zu erreichenden Verzuckerungsgrade, da in diesem Fall die Durchmischung vermutlich nicht ausreicht, damit die Enzyme effektiv hydrolysieren können.

Nachdem auch eine optimale Rührgeschwindigkeit bestimmt werden konnte, wurden nun die gesammelten Optimierungen zusammengefügt und eine Hydrolyse bei

15 rpm und finalen 20 FPU/g Biomasse durchgeführt. Dabei begann die optimierte Hydrolyse bei 10 FPU/g Biomasse und nach je 24 h wurden 5 FPU hinzugefügt. Zum Vergleich wurde eine Hydrolyse mit initialen 20 FPU/g durchgeführt, wie in Abbildung 5-20 zu erkennen ist. Von beiden Experimenten wurde der Verzuckerungsgrad [%] sowie die erreichte Endzuckerkonzentration [g/L] angegeben.

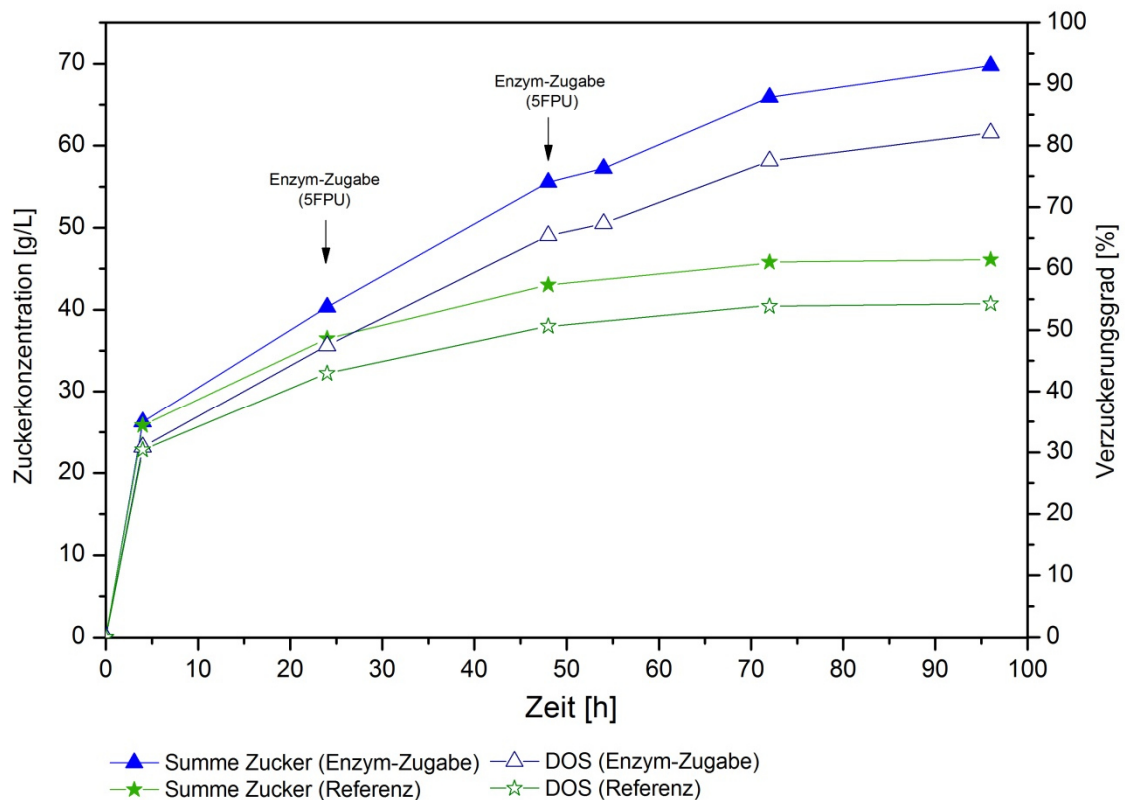


ABBILDUNG 5-20 HYDROLYSE VON NAOH-VORBEHANDELTEM WEIZENKAFF MIT 20 FPU BIOGAZYME 2X/G KAFF. VERGLEICH VON INITIALEN 20 FPU/G ZU INITIALEN 10 FPU/G MIT ENZYMZUGABEN (JE 5 FPU/G) NACH 24 UND 48 H. ENZYMATISCHE HYDROLYSE ERFOLGTE MIT BIOGAZYME 2X, PH 4,5 UND 50 °C IM VICO TESTER BEI 15 RPM

Die Referenz-Hydrolyse mit initialen 20 FPU/g Biomasse erzielt eine Zuckerkonzentration von 45 g/L und einem Verzuckerungsgrad von 62 %. Die optimierte Hydrolyse mit initialen 10 FPU/g Biomasse und mit einem Enzym-Feed von je 5 FPU/g Biomasse nach 24 und 48 h erzielt eine Zuckerkonzentration von 71 g/L und einem Verzuckerungsgrad von 82 %. Somit wird die Zuckerkonzentration um 26 g/L und der Verzuckerungsgrad um 20 % erhöht.

5.6.7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse mit NaOH-vorbehandeltem Weizenkaff enthält verschiedenste Ansatzpunkte. Die grundlegenden Parameter wie Enzymoptima (pH 4-5, 50 °C) und Hydrolysedauer (96 h) konnten schnell ermittelt und für die Folgeversuche adaptiert werden. Der Einfluss von möglichen Nebenprodukten kann bei der gewählten Vorbehandlungsmethode vernachlässigt werden, da nur Acetat als Abbauprodukt entsteht und die Säure des Acetats – Essigsäure, keinen signifikanten Einfluss auf die enzymatische Hydrolyse hat. Die Optimierung des Feststoffgehaltes und der Vermischung sind miteinander verwoben und stellten einen komplexen Sachverhalt dar. Durch die durchgeführten und gezeigten Versuchsreihen kann festgestellt werden, dass für die verwendete Enzymmischung Biogazyme 2x eine hohe Vermischung bei gleichzeitiger geringer Rührgeschwindigkeit die höchsten Verzuckerungsgrade generieren. Dies ist unter Nutzung eines Wendelrührers und Rührgeschwindigkeiten von ca. 15 rpm in den Experimenten der Fall. Eine ausreichend hohe und gleichmäßige Durchmischung stellt wohl auch einer der wichtigsten Parameter für hohe Feststoffkonzentrationen dar. Bei einer geringen Feststoffkonzentration von 5 % können hohe Verzuckerungsgrade erzielt werden. Wird dieser Anteil jedoch erhöht, z.B. auf 10 % Feststoffanteil, sinkt der Verzuckerungsgrad bereits um 20 % im gerührten System. Bei einem Feststoffanteil von 30 % sinkt der DOS um knapp 50 %. Dieser Ansatzpunkt muss in weiteren Studien noch genauer untersucht und optimiert werden, da hier ein großes Optimierungspotential vorliegt. Ein Ansatzpunkt wäre dabei z.B. die Verwendung eines anderen Mischsystems. Ein wichtiger Optimierungspunkt, die verwendete Enzymmenge, konnte durch die erfolgreiche Enzymzugabe in drei Schritten realisiert werden. So können mit 20 FPU Biogazyme 2x (schrittweisen Enzymzugabe siehe Abb. 5-20) ein Verzuckerungsgrad von 82 % erzielt werden. Dies entspricht einer Verbesserung der Zuckerkonzentration von 26 g/L bzw. einer Steigerung des DOS um 20 %.

6. ZUSAMMENFASSUNG & AUSBLICK

Diese Arbeit hatte das Ziel, aus einem kostengünstigen, nachwachsendem Lignocellulose Rohstoff mittels Vorbehandlung und Hydrolyse Zucker für die biotechnologische oder chemische Konversion zur Verfügung zu stellen. Die Wahl des geeigneten Rohstoffes fiel dabei auf Kaff, da diese Ressource derzeit in keinem industriellen Zweig großtechnisch verwendet wird und mit einem jährlichen, weltweiten Potential von $124 \cdot 10^6$ t auch in sehr großen Mengen zur Verfügung steht. Durch die Verwendung würde somit auch noch das derzeitige „wertlose“ Kaff für die Landwirtschaft finanziell attraktiv und die Pflanze könnte ganzheitlich genutzt werden. Jedoch nicht nur die vorhandene Menge dieser Ressource war ausschlaggebend für die Wahl des Rohstoffes, sondern Kaff wies im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten Rohstoffen (Schilf, Rübenblätter, Weizen-, Gersten-, Raps- und Sojastroh) auch einen hohen verzuckerbaren Anteil von ~60 % auf. Somit könnten $74 \cdot 10^6$ t Zucker weltweit für die Nutzung von nachhaltig produzierten Chemikalien genutzt werden.

Durch die Wahl des Rohstoffes Kaff, musste ein neues Konzept für die Vorbehandlung erstellt und optimiert werden. Zunächst wurde die Vorbehandlung unter dem Aspekt der Vermeidung der Abbauproduktbildung bei gleichzeitiger optimaler Vorbereitung für die enzymatische Hydrolyse untersucht und optimiert. Die Optimierungen der mechanischen Vorbehandlung beinhalteten dabei den Einfluss der Partikelgröße und des Mühlentyps. Die Untersuchungen zeigten, dass das Kaff auf eine Partikelgröße $\leq 0,75$ mm vermahlen werden muss, um eine maximale Verzuckerung zu generieren. Die Wahl der Mühle ist nach den Ergebnissen der Experimente zu vernachlässigen, da dort keine signifikanten Unterschiede festzustellen sind. Es zeigte sich jedoch auch, dass eine reine mechanische Vorbehandlung mit anschließender enzymatischer Hydrolyse nicht ausreichend ist, da in diesem Fall nur 33 % der verfügbaren Zucker hydrolysiert werden konnten.

Bei der thermo-chemischen Vorbehandlung wurden Versuche im Temperaturbereich von 21 – 200 °C, Zeiten zwischen 5 – 60 min und verschiedenen Säure-/Basen-Konzentration (H_2SO_4 : 0,1 + 0,65 %, NH_3 : 5 + 10 %, NaOH: 0,2 – 5 %) durchgeführt. Es konnte je ein Verfahren aus den Bereichen sauer/neutral/basisch bestimmt und so optimiert werden, dass wenig bzw. keine Zuckerabbauprodukte geniert und gleichzeitig je nach Verfahren eine fast 100 %ige Umsetzung der verfügbaren Zucker (ca. 60 % der Kaff-Trockenmasse) erzielt werden kann.

Die optimierten Verfahren bei einem Feststoffgehalt von 5 % und 100 FPU/g Kaff sind:

- LHW bei 200 °C, 10 min und einem DOS von 93 %
- 0,65 % ige Schwefelsäure bei 125 °C, 30 min und einem DOS von 94 %
- 2 % ige NaOH Vorbehandlung bei 21 °C, 15 h und einem DOS von 99 %

Die bei der Vorbehandlung gebildeten Degradationsprodukte sind bei der LHW Methode: 0,6 % Formiat, 0,2 % Furfural, 0,4 % Lävulinsäure. Bei der Vorbehandlung mit 0,65%ige Schwefelsäure bilden sich 0,4 % Formiat, 0,4 % Furfural sowie 1,6 % HMF. Bei allen Methoden wird das, durch den Aufbau der Lignocellulose bedingte Acetat, in einem Anteil von ca. 7-8 % abgespalten.

Welches Verfahren für einen möglichen Anwender das bessere Verfahren ist, kann hier nicht geklärt werden, da dies einer Kostenkalkulation bedarf. Denn die ggf. nötige Abtrennung der Degradationsprodukte muss den Kosten der Natronlauge gegenübergestellt werden. Da bei der biotechnologischen Produktion von organischen Säuren auch die Entwicklung der Hemmstofftoleranz weiter untersucht und optimiert wird, ist es vorstellbar, dass die bei der Vorbehandlung gebildeten Degradationsprodukte keinen Einfluss mehr auf die biotechnologische Konversion haben können. In der biotechnologischen Produktion von Milchsäure können z.B. verschiedene organische Säuren während der Fermentation entstehen, die bei der Kaff Vorbehandlung als Abbauprodukte entstehen. Bei der Produktion von Itaconsäure aus Kaff muss das Hydrolysat frei von sämtlichen Substanzen sein, sodass es mittels Ionentauscher aufgereinigt werden muss, damit die vorhandenen Salze und Abbauprodukte entfernt werden. Nur so kann eine effektive Itaconsäureproduktion sichergestellt werden (Krull, Eidt et al. 2017). Anhand dieser Beispiele ist zu erkennen, dass nicht generell gesagt werden kann welches Verfahren das Beste ist. Es muss immer individuell geschaut werden, ob Abbauprodukte einen negativen Einfluss auf die biotechnologische Produktion haben. Da in dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf der Vermeidung der Bildung dieser Abbauprodukte lag, wurde für die anschließende Optimierung der enzymatischen Hydrolyse das NaOH-Verfahren ausgewählt.

Für die Optimierung der enzymatischen Hydrolyse wurden die Einflussfaktoren des Feststoffgehaltes (5 – 30 %), der Rührergeometrie, der Rührgeschwindigkeit (5 – 500 rpm) und die Hydrolysedauer untersucht. Um hohe Zuckerendkonzentrationen zu erzielen müssen hohe Feststoffgehalte verwendet werden. Das beste Ergebnis hinsichtlich des Verzuckerungsgrades (99 %) wird mit einem Feststoffgehalt von 5 % erreicht. Jedoch ist die Zuckerkonzentration [g/L] in der Lösung für eine Fermentation zu gering. Daher ist der logische Schritt, die Feststoffkonzentration zu erhöhen. Eine

Erhöhung des Feststoffanteils um Faktor 2 auf 10 % Feststoffanteil bewirkt jedoch keine Verdopplung der Zuckerendkonzentration, da der DOS auf 75 % fällt. Wird der Feststoffanteil weiter erhöht auf z.B. 20 %, fällt der DOS signifikant auf 55 % ab. Versuche den erhöhten Feststoffanteil durch eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit entgegenzuwirken zeigten auch keine positiven Veränderungen des Verzuckerungsgrades. Eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit auf 500 rpm zeigte sogar eine Reduzierung des DOS um ca. 10 % im Vergleich zur besten Rührgeschwindigkeit von 15 rpm. Eine Rührgeschwindigkeit von 15 rpm und einer Hydrolysezeit von 96 h erzielten in allen Experimenten den höchsten Verzuckerungsgrad. Des Weiteren wurden die Einflussfaktoren der Enzymaktivität und der eingesetzten Enzymmenge untersucht. Durch die Feststellung, dass das Enzym nur sehr kurz eine hohe Enzymaktivität aufweist (bereits nach 48 h ein Verlust von ~40 % der anfänglichen Aktivität), kann durch eine permanente bzw. schrittweise Enzymzugabe die Gesamtenzymmenge signifikant verringert werden. So kann bei der Enzym-Feed Hydrolyse mit 20 FPU ein DOS von 82 % (entspricht einer Zuckerkonzentration von 71 g/L) erzielt werden, während in dem klassischen Ansatz (einmalige Anfangszugabe von Enzym) mit 20 FPU 26 g/L weniger Zucker und einen um 20 % verminderten Verzuckerungsgrad erzielt werden. Diese optimierten Bedingungen konnten von dem Versuchsmaßstab bereits erfolgreich auf einen 10 L Reaktor übertragen werden. Die Schwierigkeit bzw. die Probleme, die sich dabei zeigten, sind das Erreichen der sterilen Bedingungen, die für eine erfolgreiche Hydrolyse notwendig sind. In größeren Anlagen, in denen die Vorbehandlung vollautomatisch ablaufen kann, kann das Risiko, der mikrobiologischen Kontamination mit Fremdorganismen mit Sicherheit signifikant minimiert werden.

Die größte Hürde für den erfolgreichen Einsatz dieses Verfahrens liegt jedoch in den noch hohen Kosten der enzymatischen Hydrolyse. Eine Weiterentwicklung der Enzymmischungen hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und ihrer Aktivität ist zwingend erforderlich, um die eingesetzte Enzymmenge weiter zu minimieren und somit die damit verbundenen Kosten signifikant zu reduzieren. Außerdem muss das Problem mit den geringen Verzuckerungsgraden bei hohen Feststoffgehalten weiter untersucht werden. Auch hier steht sicherlich die Enzym-Entwicklung an erster Stelle, um Hemmungseffekte zu minimieren oder auszuschalten. Des Weiteren könnten andere Mischungsverfahren ebenfalls einen weiteren Vorteil erzeugen. Nur in der Summe aller Optimierungen kann die Verwendung von Lignocellulose, als aussichtsreicher Vertreter der nachwachsenden Rohstoffe, in einer biobasierten Wertschöpfungskette funktionieren und petrochemische Produkte ersetzen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abatzoglov, N., J. Bouchard, E. Chornet and R. Overend (1986). "Dilute acid depolymerization of cellulose in aqueous phase: experimental evidence of the significant presence of soluble oligomeric intermediates." The Canadian Journal of Chemical Engineering **64**(5): 781-786.
- Adler, E. (1977). "Lignin chemistry—past, present and future." Wood science and technology **11**(3): 169-218.
- Adney, B. and J. Baker (1996). "Measurement of cellulase activities." Laboratory Analytical Procedure, National Renewable Energy Laboratory. **6**, NREL/TP-510-42628.
- Álvarez, C., F. M. Reyes-Sosa and B. Díez (2016). "Enzymatic hydrolysis of biomass from wood." Microbial Biotechnology: 9(2), 149-156.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros and M. J. Negro (2010). "Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review." Bioresource Technology **101**(13): 4851-4861.
- Anders, N. (2014). Hydrolyse von agrarischen Rest- und Rohstoffen: Katalysatorscreening für die Verzuckerung von Weizenkaff, TU Braunschweig.
- Balat, M. (2011). "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review." Energy Conversion and Management **52**(2): 858-875.
- Bali, G., X. Meng, J. I. Deneff, Q. Sun and A. J. Ragauskas (2015). "The Effect of Alkaline Pretreatment Methods on Cellulose Structure and Accessibility." ChemSusChem **8**(2): 275-279.
- BALS, Bryan D., et al. Enzymatic hydrolysis of pelletized AFEX™-treated corn stover at high solid loadings. *Biotechnology and bioengineering*, 2014, 111. Jg., Nr. 2, S. 264-271.
- Barcelos, C. A., V. A. Rocha, C. Groposo, A. M. d. Castro and N. P. Jr (2015). Enzymes and Accessory Proteins Involved in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production Mycology: Current and Future Developments. **Vol.1**: 23-56 (34).
- Belitz, H.-D., Grosch, W. (2008). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer-Verlag. Berlin
- Beneke, F. and J. Rumpler (2013). Application of sensitivity models for renewable resources and co-products. First International Conference on Resource Efficiency in Interorganizational Networks - ResEff 2013.

- Berlin, A., M. Balakshin, N. Gilkes, J. Kadla, V. Maximenko, S. Kubo and J. Saddler (2006). "Inhibition of cellulase, xylanase and β -glucosidase activities by softwood lignin preparations." Journal of Biotechnology **125**(2): 198-209.
- Binder, J. B. and R. T. Raines (2010). "Fermentable sugars by chemical hydrolysis of biomass." Proceedings of the National Academy of Sciences **107**(10): 4516-4521.
- Bitra, V. S., A. R. Womac, N. Chevanan, P. I. Miu, C. Igathinathane, S. Sokhansanj and D. R. Smith (2009). "Direct mechanical energy measures of hammer mill comminution of switchgrass, wheat straw, and corn stover and analysis of their particle size distributions." Powder Technology **193**(1): 32-45.
- Bjerre, A. B., A. B. Olesen, T. Fernqvist, A. Plöger and A. S. Schmidt (1996). "Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose." Biotechnology and Bioengineering **49**(5): 568-577.
- Bledzki, A. K., A. A. Mamun and J. Volk (2010). "Barley husk and coconut shell reinforced polypropylene composites: the effect of fibre physical, chemical and surface properties." Composites Science and Technology **70**(5): 840-846.
- Brandt, A., M. J. Ray, T. Q. To, D. J. Leak, R. J. Murphy and T. Welton (2011). "Ionic liquid pretreatment of lignocellulosic biomass with ionic liquid-water mixtures." Green Chemistry **13**(9): 2489-2499.
- Brennan, M. A. and C. E. Wyman (2004). "Initial evaluation of simple mass transfer models to describe hemicellulose hydrolysis in corn stover." Applied biochemistry and biotechnology **115**(1-3): 965-976.
- Brosowski, A., et al. (2015). Biomassepotenziale von Rest-und Abfallstoffen - Status Quo in Deutschland. Gülzow-Prüzen, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR).Schriftenreihe nachwachsende Rohstoffe Band **36**, ISBN 978-3-942147-29-3.
- Buratti, C., M. Barbanera and E. Lascaro (2014). "Ethanol production from vineyard pruning residues with steam explosion pretreatment." Environmental Progress & Sustainable Energy: 34(3), 802-809.
- Bussemaker, M. J., F. Xu and D. Zhang (2013). "Manipulation of ultrasonic effects on lignocellulose by varying the frequency, particle size, loading and stirring." Bioresource Technology **148**: 15-23.

- Cabrera, E., M. J. Muñoz, R. Martín, I. Caro, C. Curbelo and A. B. Díaz (2015). "Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability." Bioresource Technology **194**: 1-6.
- Canilha, L., W. Carvalho, J. Batista and A. e. Silva (2006). "Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation." Journal of the Science of Food and Agriculture **86**(9): 1371-1376.
- Chandel, A. K., Antunes F. A., (2012). Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: state-of-the-art. In: da Silva S., Chandel A. (eds) D-Xylitol, Springer-Verlag, Berlin: 39-61.
- Chandel, A. K., R. K. Kapoor, A. Singh and R. C. Kuhad (2007). "Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501." Bioresource Technology **98**(10): 1947-1950.
- Chang, V. S. and M. T. Holtzapple (2000). "Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity." Applied Biochemistry and Biotechnology **84**(1): 5-37.
- Chen, M., J. Zhao and L. Xia (2009). "Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility." Biomass and Bioenergy **33**(10): 1381-1385.
- Chen, Y., R. R. Sharma-Shivappa, D. Keshwani and C. Chen (2007). "Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production." Appl. Biochem. Biotechnol. **142**: 276-290.
- Cheng, Y. S., Y. Zheng, C. W. Yu, T. M. Dooley, B. M. Jenkins and J. S. VanderGheynst (2010). "Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw." Applied Biochemistry and Biotechnology **162**(6): 1768-1784.
- Cherubini, F. and A. H. Strömman (2010). "Production of Biofuels and Biochemicals from Lignocellulosic Biomass: Estimation of Maximum Theoretical Yields and Efficiencies Using Matrix Algebra." Energy & Fuels **24**(4): 2657-2666.
- Chum, H. L., D. K. Johnson, S. Black, J. Baker, K. Grohmann, K. V. Sarkanen, K. Wallace and H. A. Schroeder (1988). "Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: I. Enzyme hydrolysis of cellulosic residues." Biotechnology and Bioengineering **31**(7): 643-649.
- Coimbra, M. C., A. Duque, F. Saéz, P. Manzanares, C. H. Garcia-Cruz and M. Ballesteros (2016). "Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis." Renewable Energy **86**: 1060-1068.

- Craig, W., E. Coxworth and Z. Stiasny (1987). Chaff-collection costs and processing options. Sixth Canadian bioenergy R&D seminar. Proceedings of the seminar held at Richmond, British Columbia, Canada, 16-18 February 1987, Elsevier Applied Science.
- da Silva, A. S. A., H. Inoue, T. Endo, S. Yano and E. P. Bon (2010). "Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation." Bioresource technology **101**(19): 7402-7409.
- Davison, B. H., J. Parks, M. F. Davis and B. S. Donohoe (2013). Plant cell walls: basics of structure, chemistry, accessibility and the influence on conversion. Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.: 23-38.
- Destatis (2017). Bodennutzung der Betriebe - Landwirtschaftlich genutzte Flächen. S. Bundesamt. Fachserie 3, Reihe 3. **(01.02.2017)**.
- Eisenhuber, K., K. Krennhuber, V. Steinmüller and A. Jäger (2013). "Comparison of Different Pre-treatment Methods for Separating Hemicellulose from Straw During Lignocellulose Bioethanol Production." Energy Procedia **40**(0): 172-181.
- Elgharbawy, A. A., M. Z. Alam, M. Moniruzzaman and M. Goto (2016). "Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass." Biochemical Engineering Journal **109**: 252-267.
- Engel, P., S. Krull, B. Seiferheld and A. C. Spiess (2012). "Rational approach to optimize cellulase mixtures for hydrolysis of regenerated cellulose containing residual ionic liquid." Bioresource Technology **115**: 27-34.
- Ertas, M., Q. Han, H. Jameel and H.-m. Chang (2014). "Enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed wheat straw followed by refining to produce fermentable sugars." Bioresource Technology **152**: 259-266.
- Fagan, R. D., H. E. Grethlein, A. O. Converse and A. Porteous (1971). "Kinetics of the acid hydrolysis of cellulose found in paper refuse." Environmental Science & Technology **5**(6): 545-547.
- Fan, J., M. De bruyn, V. L. Budarin, M. J. Gronnow, P. S. Shuttleworth, S. Breeden, D. J. Macquarrie and J. H. Clark (2013). "Direct Microwave-Assisted Hydrothermal Depolymerization of Cellulose." Journal of the American Chemical Society **135**(32): 11728-11731.
- Fan, L.-t., M. M. Gharpuray, (1987). Cellulose hydrolysis, Springer-Verlag, Berlin.

Fockink, Douglas H., et al. "Enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse: Effect of enzyme loading and substrate total solids on its fractal kinetic modeling and rheological properties." *Energy & Fuels* 31.6 (2017): 6211-6220.

Fu, D., G. Mazza and Y. Tamaki (2010). "Lignin Extraction from Straw by Ionic Liquids and Enzymatic Hydrolysis of the Cellulosic Residues." Journal of Agricultural and Food Chemistry 58(5): 2915-2922.

Galbe, M. and G. Zacchi (2012). "Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials." Biomass and Bioenergy 46: 70-78.

Gao, X., R. Kumar and C. E. Wyman (2014). "Fast hemicellulose quantification via a simple one-step acid hydrolysis." Biotechnology and Bioengineering: 111(6), 1088-1096.

Gáspár, M., G. Kálmán and K. Réczey (2007). "Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production." Process Biochemistry 42(7): 1135-1139.

Ghose, T. (1987). "Measurement of cellulase activities." Pure and applied Chemistry 59(2): 257-268.

Girisuta, B., K. Dussan, D. Haverty, J. J. Leahy and M. H. B. Hayes (2013). "A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid." Chemical Engineering Journal 217: 61-70.

Govumoni, S. P., S. Koti, S. Y. Kothagouni, V. S and V. R. Linga (2013). "Evaluation of pretreatment methods for enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production." Carbohydrate Polymers 91(2): 646-650.

Grilc, M., B. Likozar and J. Levec (2014). "Hydrotreatment of solvolytically liquefied lignocellulosic biomass over NiMo/Al₂O₃ catalyst: Reaction mechanism, hydrodeoxygenation kinetics and mass transfer model based on FTIR." Biomass and Bioenergy 63: 300-312.

Guragain, Y. N., J. De Coninck, F. Husson, A. Durand and S. K. Rakshit (2011). "Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth." Bioresource Technology 102(6): 4416-4424.

Hall, M. B. (2015). "Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method: Collaborative study." Journal of AOAC International 98(2): 397-409.

- Hames, B., Scarlata, C., & Sluiter, A. (2008). Determination of protein content in biomass. National Renewable Energy Laboratory, 1-5.
- Harmsen, P. F. H., et al. *Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass*. No. 1184. Wageningen UR-Food & Biobased Research, 2010.
- Hendriks, A. T. W. M. and G. Zeeman (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." Bioresource Technology **100**(1): 10-18.
- Hirschberg, H. G. (1999). Handbuch der Verfahrenstechnik und Anlagenbau. Springer-Verlag, Berlin.
- Holtzapple, M. T., A. E. Humphrey and J. D. Taylor (1989). "Energy requirements for the size reduction of poplar and aspen wood." Biotechnology and Bioengineering **33**(2): 207-210.
- Hu, F., S. Jung and A. Ragauskas (2012). "Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis." Bioresource Technology **117**(0): 7-12.
- Humpala, J. F., N. Uppugundla, R. Vismeh, L. Sousa, S. P. S. Chundawat, A. D. Jones, V. Balan, B. E. Dale and A. M. Cheh (2014). "Probing the nature of AFEX-pretreated corn stover derived decomposition products that inhibit cellulase activity." Bioresource Technology **152**(0): 38-45.
- Jang, S.-K., H.-Y. Kim, H.-S. Jeong, J.-Y. Kim, H. Yeo and I.-G. Choi (2016). "Effect of ethanol organosolv pretreatment factors on enzymatic digestibility and ethanol organosolv lignin structure from *Liriodendron tulipifera* in specific combined severity factors." Renewable Energy **87, Part 1**: 599-606.
- Kamm, B., Gruber P.R., "Biorefineries-industrial processes and products." in *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry* (2007), Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Keim, W., M. Röper (2010). Positionspapier: Rohstoffbasis im Wandel. GDCh, Dechema.
- Kim, T. H., J. S. Kim, C. Sunwoo and Y. Y. Lee (2003). "Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia." Bioresource Technology **90**(1): 39-47.
- Kim, Y., T. Kreke, N. S. Mosier and M. R. Ladisch (2013). "Severity factor coefficients for subcritical liquid hot water pretreatment of hardwood chips." Biotechnology and Bioengineering: 111(2), 254-263.
- Klemm, D., B. Heublein, H.-P. Fink and A. Bohn (2005). "Cellulose: faszinierendes Biopolymer und nachhaltiger Rohstoff." Angewandte Chemie **117**(22): 3422-3458.

- Klinke, H. B., A. B. Thomsen and B. K. Ahring (2004). "Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass." Applied Microbiology and Biotechnology **66**(1): 10-26.
- Kollmann, F. (1951). Holzverzuckerung. In Anatomie und Pathologie, Chemie, Physik Elastizität und Festigkeit. Springer-Verlag, Berlin: 221-238.
- Kristensen, J. B., C. Felby and H. Jørgensen (2009). "Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose." Biotechnology for Biofuels **2**(1): 1-10.
- Krull S, Eidt L, Hevekerl A, Kuenz A, Prüße U (2017) Itaconic acid production from wheat chaff by *ASPERGILLUS TERREUS*. *Process Biochem.* **63**:169-176
- Kumar, A., A. Gautam and D. Dutt (2016). "Biotechnological Transformation of Lignocellulosic Biomass in to Industrial Products: An Overview." Advances in Bioscience and Biotechnology **7**: 149-168.
- Kumar, P., D. M. Barrett, M. J. Delwiche and P. Stroeve (2009). "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production." Industrial & Engineering Chemistry Research **48**(8): 3713-3729.
- Kumar, R., G. Mago, V. Balan and C. E. Wyman (2009). "Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies." Bioresource Technology **100**(17): 3948-3962.
- Kumar, R., S. Singh and O. V. Singh (2008). "Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **35**(5): 377-391.
- Kumar, R. and C. E. Wyman (2009). "Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology?" Bioresource Technology **100**(18): 4193-4202.
- Kumar, R. and C. E. Wyman (2009). "Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies." Biotechnology Progress **25**(2): 302-314.
- Kuznetsov, B. N., I. G. Sudakova, N. V. Garyntseva, L. Djakovitch and C. Pinel (2013). "Kinetic study of aspen-wood sawdust delignification by H₂O₂ with sulfuric acid catalyst under mild conditions." Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis **110**(2): 271-280.

- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi and N.-O. Nilvebrant (1999). "The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood." Enzyme and Microbial Technology **24**(3-4): 151-159.
- Li, H., Y. Pu, R. Kumar, A. J. Ragauskas and C. E. Wyman (2013). "Investigation of lignin deposition on cellulose during hydrothermal pretreatment, its effect on cellulose hydrolysis, and underlying mechanisms." Biotechnology and Bioengineering: **111**(3), 485-492.
- Li, Y., U. Merrettig-Bruns, S. Strauch, S. Kabasci and H. Chen (2014). "Optimization of ammonia pretreatment of wheat straw for biogas production." Journal of Chemical Technology & Biotechnology: **90**(1), 130-138.
- Lloyd, T. A. and C. E. Wyman (2005). "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids." Bioresource Technology **96**(18): 1967-1977.
- Mabrouk, A., X. Erdocia, M. G. Alriols, M. R. Jeday and J. Labidi (2016). "Exergy analysis: An optimization tool for the performance evaluation of an organosolv process." Applied Thermal Engineering **106**: 1062-1066.
- Marti, F., et al. Collecting and use of chaff. In: *Energy, biomass and biological residues. International Conference of Agricultural Engineering-CIGR-AgEng 2012: Agriculture and Engineering for a Healthier Life, Valencia, Spain, 8-12 July 2012*. CIGR-EurAgEng, 2012.
- Martin, C., B. Alriksson, A. Sjöde, N.-O. Nilvebrant and L. J. Jönsson (2007). "Dilute sulfuric acid pretreatment of agricultural and agro-industrial residues for ethanol production." Applied Biochemistry and Biotechnology **137**(1-12): 339-352.
- Martín, C., G. J. d. M. Rocha, J. R. A. d. Santos, M. C. d. A. Wanderley and E. R. Gouveia (2012). "Enzyme loading dependence of cellulose hydrolysis of sugarcane bagasse." Química Nova **35**: 1927-1930.
- McCarthy, J. L. and A. Islam (1999). "Lignin Chemistry, Technology, and Utilization: A Brief History." **742**: 2-99.
- McCartney, D. H., H. C. Block, P. L. Dubeski and A. J. Ohama (2006). "Review: The composition and availability of straw and chaff from small grain cereals for beef cattle in western Canada." Canadian Journal of Animal Science **86**(4): 443-455.
- McIntosh, S., Z. Zhang, J. Palmer, H.-H. Wong, W. O. S. Doherty and T. Vancov (2016). "Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by

- dilute acid and steam explosion." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **10**(4): 346-358.
- Medie, F. M., G. J. Davies, M. Drancourt and B. Henrissat (2012). "Genome analyses highlight the different biological roles of cellulases." Nat Rev Micro **10**(3): 227-234.
- Mes-Hartree, M., B. E. Dale and W. K. Craig (1988). "Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose." Applied Microbiology and Biotechnology **29**(5): 462-468.
- Mesa, L., E. González, C. Cara, E. Ruiz, E. Castro and S. I. Mussatto (2010). "An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **85**(8): 1092-1098.
- Michels, J. et al. (2014). Lignocellulose-Bioraffinerie. Gemeinsamer Abschlussbericht zu den wiss.-techn. Ergebnissen. DECHEMA e.V.
- Millett, M. A., M. J. Effland and D. F. Caulfield (1979). "Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials-acid vs. enzymatic." Adv Chem Series **181**: 71-89.
- Modenbach, A. (2013). "Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modeling and glucose recovery." Thesis and Dissertations-Biosystems and Agricultural Engineering. 17.
- Mosier, N., R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak and M. R. Ladisch (2005). "Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover." Bioresource Technology **96**(18): 1986-1993.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple and M. Ladisch (2005). "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass." Bioresource Technology **96**(6): 673-686.
- Mussatto, S. I. and J. Teixeira (2010). "Lignocellulose as raw material in fermentation processes." Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology (Méndez-Vilas, A., Ed.) **2**: 897-907.
- Nevell, T. P. and W. R. Upton (1976). "The hydrolysis of cotton cellulose by hydrochloric acid in benzene." Carbohydrate Research **49**: 163-174.
- Nimz, H. (1974). "Das Lignin der Buche — Entwurf eines Konstitutionsschemas." Angewandte Chemie **86**(9): 336-344.

- Noori, M. S. and K. Karimi (2016). "Detailed study of efficient ethanol production from elmwood by alkali pretreatment." Biochemical Engineering Journal **105**: 197-204.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification." Bioresource Technology **74**(1): 17-24.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000). "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition." Bioresource Technology **74**(1): 25-33.
- Parawira, W., J. S. Read, B. Mattiasson and L. Björnsson (2008). "Energy production from agricultural residues: High methane yields in pilot-scale two-stage anaerobic digestion." Biomass and Bioenergy **32**(1): 44-50.
- Pedersen, M. and A. S. Meyer (2009). "Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw." Biotechnology Progress **25**(2): 399-408.
- Pedersen, M. and A. S. Meyer (2010). "Lignocellulose pretreatment severity - relating pH to biomatrix opening." New Biotechnology **27**(6): 739-750.
- Pérez, J. A., I. Ballesteros, M. Ballesteros, F. Sáez, M. J. Negro and P. Manzanares (2008). "Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production." Fuel **87**(17-18): 3640-3647.
- Perlack, R., L. Wright and A. Turhollow (2005). "Biomass as a Feedstock for a Bioenergy and Bioproducts Industry: the Technical Feasibility of a Billion-Ton Annual Supply. Oak Ridge National Laboratory, DOI: 10.2172/885984.
- Philippidis, G. P., T. K. Smith and C. E. Wyman (1993). "Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process." Biotechnology and Bioengineering **41**(9): 846-853.
- Phitsuwan, P., K. Sakka and K. Ratanakhanokchai (2013). "Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability." Biomass and Bioenergy **58**: 390-405.
- Pryor, S. W. and N. Nahar (2010). "Deficiency of Cellulase Activity Measurements for Enzyme Evaluation." Applied Biochemistry and Biotechnology **162**(6): 1737-1750.
- Quiroz-Castañeda, R. E. and J. L. Folch-Mallol (2013). Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In Sustainable Degradation of

Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization. InTech, Wien, DOI: 10.5772/53719.

Chandel, A.K., da Silva, S.S.. "Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production." Biofuel production-Recent developments and prospects. InTech, Wien, 2011.

Ralph, J., K. Lundquist, G. Brunow, F. Lu, H. Kim, P. F. Schatz, J. M. Marita, R. D. Hatfield, S. A. Ralph and J. H. Christensen (2004). "Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids." Phytochemistry Reviews 3(1-2): 29-60.

Ramirez, R. S., M. Holtzapple and N. Piamonte (2013). Fundamentals of biomass pretreatment at high pH. In Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.: 145-167.

Rasmussen, H., H. R. Sørensen and A. S. Meyer (2014). "Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms." Carbohydrate Research 385: 45-57.

Rumpler, J. (2014). "Das Kompakternteverfahren: Eine neue Entwicklung im Mähdrusch." LOP 6/2014: 26-29.

Saeman, J. F., W. E. Moore, R. L. Mitchell and M. A. Millett (1954). "Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography." Tappi Journal 37(8): 336-343.

Saha, B. C. and M. A. Cotta (2006). "Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw." Biotechnology Progress 22(2): 449-453.

Saha, B. C. and M. A. Cotta (2010). "Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol." New Biotechnology 27(1): 10-16.

Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta and Y. V. Wu (2005). "Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol." Process Biochemistry 40(12): 3693-3700.

Saini, J. K., A. K. Patel, M. Adsul and R. R. Singhania (2016). "Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass." Renewable Energy 98: 29-42.

Sanchez, A., G. Magaña, D. Gomez, M. Solís and R. Banares-Alcantara (2014). "Bidimensional sustainability analysis of lignocellulosic ethanol production

processes. Method and case study." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **8**(5): 670-685.

Sannigrahi, P., D. H. Kim, S. Jung and A. Ragauskas (2011). "Pseudo-lignin and pretreatment chemistry." Energy & Environmental Science **4**(4): 1306-1310.

Sannigrahi, P. and A. J. Ragauskas (2013). Fundamentals of biomass pretreatment by fractionation. In Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.: 201-222.

Sattler, W., H. Esterbauer, O. Glatter and W. Steiner (1989). "The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose." Biotechnology and Bioengineering **33**(10): 1221-1234.

Scholler, H. (1937). Anlage zur Verzuckerung von cellulosehaltigen Stoffen. DE0000000643916, DE0000000646811.

Sella Kapu, N. and H. L. Trajano (2014). "Review of hemicellulose hydrolysis in softwoods and bamboo." Biofuels, Bioproducts and Biorefining: **8**(6), 857-870.

Sequeira, S., C. Casanova and E. Cabrita (2006). "Deacidification of paper using dispersions of Ca (OH) 2 nanoparticles in isopropanol. Study of efficiency." Journal of Cultural Heritage **7**(4): 264-272.

Shrotri, A., L. K. Lambert, A. Tanksale and J. Beltramini (2013). "Mechanical depolymerisation of acidulated cellulose: understanding the solubility of high molecular weight oligomers." Green Chemistry **15**(10): 2761-2768.

Shuai, W., N. Chen, B. Li, D. Zhou and J. Gao (2016). "Life cycle assessment of common reed (*Phragmites australis* (Cav) Trin. ex Steud) cellulosic bioethanol in Jiangsu Province, China." Biomass and Bioenergy **92**: 40-47.

Shui, T., S. Feng, Z. Yuan, T. Kuboki and C. Xu (2016). "Highly efficient organosolv fractionation of cornstalk into cellulose and lignin in organic acids." Bioresource Technology **218**: 953-961.

Singh, S. and B. A. Simmons (2013). Ionic liquid pretreatment: mechanism, performance, and challenges. In Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd.: 223-238.

Sluiter, A., B. Hames, D. Hyman, C. Payne, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Tempelton and J. Wolfe (2008). "Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved

Solids in Liquid Process Samples." Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Laboratory.

Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter and D. Templeton (2006). "Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples." Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory.

Specht, H. (1955). "Der Stand des Rheinauer Holzchemie-Verfahrens-Ende des Jahres 1955." 57-63.

Sun, B., L. Duan, G. Peng, X. Li and A. Xu (2015). "Efficient production of glucose by microwave-assisted acid hydrolysis of cellulose hydrogel." Bioresource Technology **192**: 253-256.

Sun, B., G. Peng, L. Duan, A. Xu and X. Li (2015). "Pretreatment by NaOH swelling and then HCl regeneration to enhance the acid hydrolysis of cellulose to glucose." Bioresource Technology **196**: 454-458.

Sun, Y. and J. Cheng (2002). "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." Bioresource Technology **83**(1): 1-11.

Sun, Y. and J. J. Cheng (2005). "Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production." Bioresour. Technol. **96**: 1599.

Taherzadeh, M. J. and K. Karimi (2007). "Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review." BioResources **2**(3): 472-499.

Tarkow, H. and W. C. Feist (1969). A Mechanism for Improving the Digestibility of Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid Ammonia. Cellulases and Their Applications, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **95**: 197-218.

Trajano, H. L. and C. E. Wyman (2013). Fundamentals of Biomass Pretreatment at Low pH. In Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd: 103-128.

Tumuluru, J. S., L. Tabil, Y. Song, K. Iroba and V. Meda (2014). "Grinding energy and physical properties of chopped and hammer-milled barley, wheat, oat, and canola straws." Biomass and Bioenergy **60**: 58-67.

Tuse, D., T. Tu and K. A. McDonald (2014). "Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes." Biomed Res Int **2014**: 256135.

Walker, L. P. and D. B. Wilson (1991). "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview." Bioresource Technology **36**(1): 3-14.

- Walsum, G. P., S. Allen, M. Spencer, M. Laser, M. Antal, Jr. and L. Lynd (1996). Conversion of Lignocellulosics Pretreated with Liquid Hot Water to Ethanol. In Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Humana Press. **57/58**: 157-170.
- Wang, B. (2007). Environmental biodegradation research focus. Nova Publishers.
- Wang, W., Q. Wang, X. Tan, W. Qi, Q. Yu, G. Zhou, X. Zhuang and Z. Yuan (2016). "High conversion of sugarcane bagasse into monosaccharides based on sodium hydroxide pretreatment at low water consumption and wastewater generation." Bioresource Technology **218**: 1230-1236.
- Wang, X., Y. Deng, S. Wang, C. Liao, Y. Meng and T. Pham (2013). "Nanoscale characterization of reed stalk fiber cell walls." BioResources **8**(2): 1986-1996.
- Wang, Z., D. R. Keshwani, A. P. Redding and J. J. Cheng (2010). "Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass." Bioresour Technol **101**(10): 3583-3585.
- Ward, L. (2015). POET-DSM Projekt LIBERTY. DOE Bioenergy Technologies Office.
- Wenzl Hermann, F. J. (1954). Chemie und Technik der Säurehydrolyse des Holzes. I. Chemische Betrachtungen. Holzforschung - International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood. **8**: 103-116.
- Werpy, Todd, et al. *Top value added chemicals from biomass. Volume 1-Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas*. No. DOE/GO-102004-1992. Department of Energy Washington DC, 2004.
- Wyman, C. (1996). Handbook on bioethanol: production and utilization, CRC press.
- Wyman, C. E. (1994). "Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation." Applied Biochemistry and Biotechnology **45**(1): 897-915.
- Wyman, C. E. (2007). "What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol." Trends in Biotechnology **25**(4): 153-157.
- Wyman, C. E. (2013). Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals, John Wiley & Sons.
- Wyman, C. E., B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch and Y. Y. Lee (2005). "Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover." Bioresource Technology **96**(18): 2026-2032.

Wyman, C. E. and N. D. Hinman (1990). "Ethanol." Applied Biochemistry and Biotechnology **24**(1): 735-753.

Xiao, Z., X. Zhang, D. J. Gregg and J. N. Saddler (2004). "Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates." Applied Biochemistry and Biotechnology **115**(1): 1115-1126.

Ximenes, E., Y. Kim and M. R. Ladisch (2013). Biological Conversion of Plants to Fuels and Chemicals and the Effects of Inhibitors. In Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals. C. E. Wyman, John Wiley & Sons, Ltd: 39-60.

Xu, J., J. J. Cheng, R. R. Sharma-Shivappa and J. C. Burns (2010). "Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production." Bioresour. Technol. **101**: 2900.

Xu, J., J. J. Cheng, R. R. Sharma-Shivappa and J. C. Burns (2010). "Sodium Hydroxide Pretreatment of Switchgrass for Ethanol Production." Energy & Fuels **24**(3): 2113-2119.

Yang, B. and C. E. Wyman (2004). "Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose." Biotechnology and Bioengineering **86**(1): 88-98.

Yang, B. and C. E. Wyman (2008). "Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol." Biofuels, Bioproducts and Biorefining **2**(1): 26-40.

Yang, M., W. Li, B. Liu, Q. Li and J. Xing (2010). "High-concentration sugars production from corn stover based on combined pretreatments and fed-batch process." Bioresource Technology **101**(13): 4884-4888.

Yu, M., J. Li, S. Chang, L. Zhang, Y. Mao, T. Cui, Z. Yan, C. Luo and S. Li (2016). "Bioethanol production using the sodium hydroxide pretreated sweet sorghum bagasse without washing." Fuel **175**: 20-25.

Yu, Q., X. Zhuang, Z. Yuan, Q. Wang, W. Qi, W. Wang, Y. Zhang, J. Xu and H. Xu (2010). "Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose." Bioresource Technology **101**(13): 4895-4899.

Zarzar, L. D., J. A. Kalow, X. He, J. J. Walish and T. M. Swager (2017). "Optical visualization and quantification of enzyme activity using dynamic droplet lenses." Proceedings of the National Academy of Sciences **114**(15): 3821-3825.

- Zeller, V., et al. (2012). Basisinformationen für eine nachhaltige Nutzung von landwirtschaftlichen Reststoffen zur Bioenergiebereitstellung. DBFZ Report Nr. 13.
- Zhang, P. P., D. S. Tong, C. X. Lin, H. M. Yang, Z. K. Zhong, W. H. Yu, H. Wang and C. H. Zhou (2014). "Effects of acid treatments on bamboo cellulose nanocrystals." Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering: 9(5), 686-695.
- Zhao, X., L. Zhang and D. Liu (2012). "Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose." Biofuels, Bioproducts and Biorefining 6(4): 465-482.
- Zhao, Y., Y. Wang, J. Y. Zhu, A. Ragauskas and Y. Deng (2008). "Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature." Biotechnology and Bioengineering 99(6): 1320-1328.
- Zheng, J., K. Choo, C. Bradt, R. Lehoux and L. Rehmann (2014). "Enzymatic hydrolysis of steam exploded corncob residues after pretreatment in a twin-screw extruder." Biotechnology Reports 3: 99-107.

8. ANHANG

A ERGÄNZENDE ABBILDUNGEN

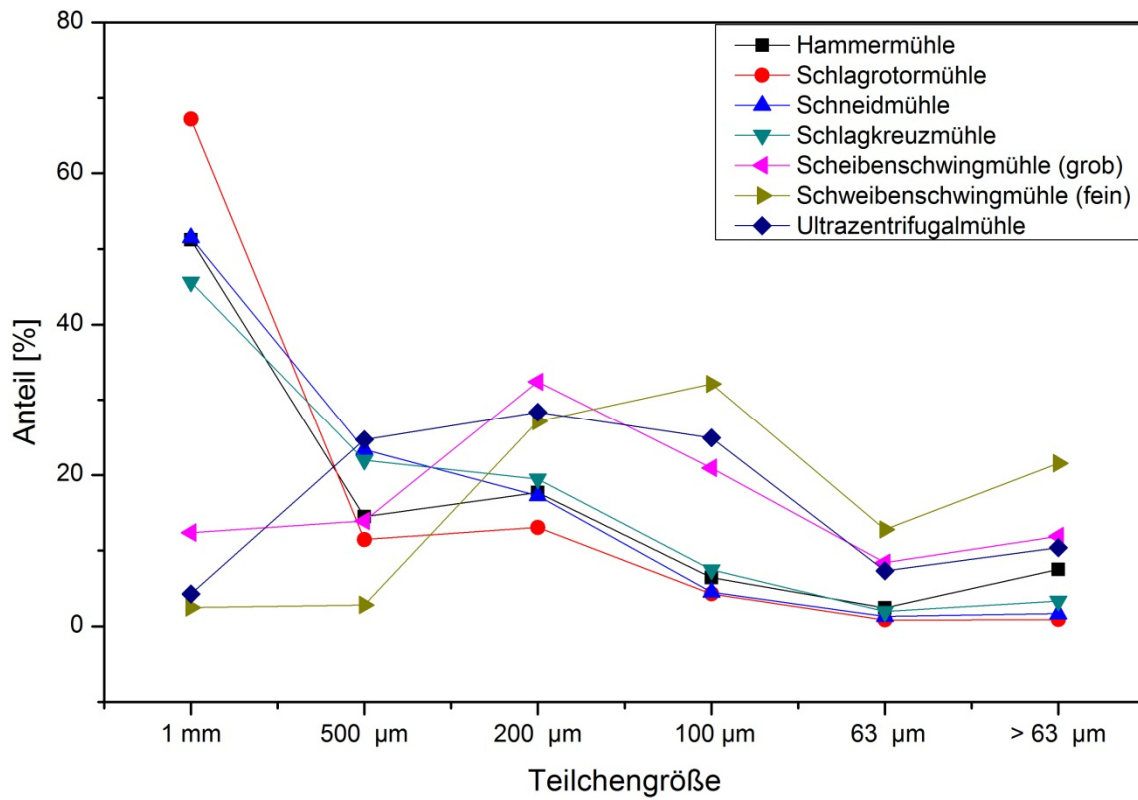


ABBILDUNG 8-1 PARTIKELGRÖßENVERTEILUNG NACH VERMAHLUNG MIT UNTERSCHIEDLICHEN MÜHLENTYPEN

B ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1 Eine mögliche biobasierte Wertschöpfungskette	6
Abbildung 3-1 Pflanzenzellwandaufbau der Lignocellulose: Abgebildet sind die Hauptkomponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin. Abbildung verändert nach (Mosier, Wyman et al. 2005, Davison, Parks et al. 2013, Phitsuwan, Sakka et al. 2013, Ximenes, Kim et al. 2013).....	10
Abbildung 3-2 Celluloseaufbau: bestehend aus Cellobiosoeinheiten, mit β -1,4 verknüpfter Glucose, verändert nach (Belitz, Grosch et al. 2008)	11
Abbildung 3-3 Möglicher Hemicelluloseaufbau aus Xylan, teilacetyliert, verändert nach (Wang 2007, Wyman 2013)	12
Abbildung 3-4 Mögliche Kohlenhydratmonomere nach Hydrolyse von Hemicellulose	13
Abbildung 3-5 Ligninstuktur mit Cumaryl-, Sinapyl- und Coniferyleinheiten als Hauptkomponenten, die über Ester- und Etherbrücken in das Ligninnetzwerk eingebunden sind, verändert nach (Adler 1977, Ralph, Lundquist et al. 2004)	14
Abbildung 3-6 Funktionsprinzip der Vorbehandlung von Biomasse, abgebildet sind die Hauptkomponenten Cellulose, Hemicellulose, Lignin, und die Pflanzenzellwand, verändert nach (Kumar, Mago et al. 2009)	15
Abbildung 3-7 Entstehung von Degradationsprodukten durch die Vorbehandlung aus Lignocellulose, verändert nach (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000)	16
Abbildung 3-8 Mechanismus der Säurekatalysierten Hydrolyse nach (Nevell and Upton 1976, Belitz, Grosch et al. 2008).....	20
Abbildung 3-9 Schema der enzymatischen Hydrolyse von amorpher und kristalliner Cellulose verändert nach (Medie, Davies et al. 2012, Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol 2013, Barcelos, Rocha et al. 2015)	21
Abbildung 3-10 Weizenkaff (bestehend aus Spelzen, Hülsen und Grannen) und Strohreste.....	22
Abbildung 4-1 Aufbau des Parr-Reaktors.....	28
Abbildung 4-2 Mikrowellensystem der Vorbehandlungen	29
Abbildung 4-3 geschütteltes Hydrolysesystem: HLC Thermoschüttler.....	31
Abbildung 4-4 gerührtes Hydrolysesystem: Haake Viscotester mit Wendelrührer ..	31
Abbildung 5-1 Einfluss der Siebgröße und der daraus resultierenden Partikelgröße auf die Zuckerkonzentration [g/g Biomasse] von Kaff nach der analytische Säurehydrolyse nach Sluiter und Hames 2006 (Sluiter, Hames et al. 2006).....	43
Abbildung 5-2 Einfluss von verschiedenen Mühlentypen auf die Zuckerkonzentration von Kaff nach enzymatischer Hydrolyse	45

Abbildung 5-3 Zellstoff-Kohlenhydrathydrolyse unter sauren Bedingungen in Abhängigkeit von der Zeit (0,8 % H_2SO_4 , 180 °C), verändert nach (Saeman, Moore et al. 1954, Girisuta, Dussan et al. 2013).....	47
Abbildung 5-4 Aufheizraten auf 200 °C des Mikrowellenaufschlussystems, des Batch-Reaktors und des Druckaufschlussreaktors.....	48
Abbildung 5-5 Wirkung von 5 % Natronlauge auf gemahlenes Kaff nach 1 h und Raumtempertaur, linkes Bild: gemahlenes Kaff, rechtes Bild: gemahlenes und mit NaOH versetztes Kaff nach 1 h.....	64
Abbildung 5-6 Vergleich der Vorbehandlung von Kaff mit NaOH, LiOH, KOH, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (je 1,25 M) für 24 h bei 21 °C mit anschließender enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h)	65
Abbildung 5-7 Optimierung der NaOH-Konzentration während der Kaff-Vorbehandlung bei 10 % Feststoffanteil und 21 °C für 24 h mit anschließender enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h)	66
Abbildung 5-8 Optimierung der 2 %igen NaOH-Einwirkzeit während der Kaff-Vorbehandlung bei 10 % Feststoffanteil und 21 °C mit anschließender enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h).....	67
Abbildung 5-9 Verzuckerungsgrad (DOS [%]) und Anteil der gebildeten Abbauprodukte [%] der optimierten Vorbehandlungsmethoden für Weizenkaff	69
Abbildung 5-10 Zucker- und Ligninbilanz der H_2SO_4 - Weizenkaffvorbehanldung und anschließender, enzymatischen Hydrolyse	71
Abbildung 5-11 Zucker- und Ligninbilanz der LHW- Weizenkaffvorbehandlung mit anschließender, enzymatischen Hydrolyse	72
Abbildung 5-12 Zucker- und Ligninbilanz der NaOH-Weizenkaffkaffvorbehandlung mit anschließender, enzymatischen Hydrolyse	73
Abbildung 5-13 Hydrolyse-Zeit-verlauf von Naoh-vorbehandeltem Weizenkaff in Abhängigkeit zum Verzuckerungsgrad (DOS) und der Zuckerkonzentration [g/L]. Enzymatische Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x, 100 FPU/g Biomasse, 5 % Feststoffkonzentration, pH 4,5 und 50 °C im Thermoshaker.....	76
Abbildung 5-14 Verlauf des Verzuckerungsgrades [%] während einer Hydrolyse sowie der Anstieg der Gesamtzuckerkonzentration [g/L] bei der Hydrolyse von NaOH vorbehandeltem Weizenkaff bei eine Feststoffkonzentration von 5 %, 100 FPU/g Biomasse bei 50 °C und einem pH von 4,5 im Thermoshaker	77
Abbildung 5-15 Hydrolyseverlauf von Kaff mit verschiedenen Cellulaseaktivitäten [5 – 200 FPU/g Biomasse] in Abhängigkeit zum Verzuckerungsgrad. Enzymatische	

Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x, 5 % Feststoffkonzentration, pH 4,5 und 50 °C im Thermoshaker	79
Abbildung 5-16 Cellulasestabilität von Biogazyme 2x in Abhängigkeit zur Zeit von Kaff. Das Enzym wurde dabei in einem 0,01 M Acetatpuffer (pH 4,5) bei 50 °C im ViscoTester bei 10 rpm gerührt. Die Bestimmung der Cellulaseaktivität erfolgte nach Ghose (Ghose 1987).....	80
Abbildung 5-17 Einfluss der Degradationsprodukte Vanillin, Ethanol, Ameisensäure, HMF, Furfural, Essigsäure und Lävulinsäure auf den Verzuckerungsgrad mittels enzymatischer Hydrolyse von Cellulose. Enzymatische Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x (20 FPU/g Cellulose), 5 % Feststoffgehalt, pH 4,5 und 50 °C im Thermoshaker	82
Abbildung 5-18 Vergleich von geschüttelter und gerührter enzymatischen Hydrolyse von Kaff bei variierender Feststoffkonzentration zwischen 5 und 30 %. Enzymatische Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x (100 FPU/g Cellulose), pH 4,5 und 50 °C im VicoTester bei 15 rpm.....	83
Abbildung 5-19 Optimierung des Verzuckerungsgrades von Kaff in Abhängigkeit zur Rührgeschwindigkeit bei der enzymatischen Hydrolyse im ViscoTester mit Wendelrührer. Enzymatische Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x (100 FPU/g Biomasse), 5 % Feststoffgehalt, pH 4,5 und 50 °C.....	85
Abbildung 5-20 Hydrolyse von NaOH-vorbehandeltem Weizenkaff mit 20 FPU Biogazyme 2x/g Kaff. Vergleich von inititalen 20 FPU/g zu initialen 10 FPU/g mit Enzymzugaben (je 5 FPU/g) nach 24 und 48 h. Enzymatische Hydrolyse erfolgte mit Biogazyme 2x, pH 4,5 und 50 °C im VicoTester bei 15 rpm	86
Abbildung 8-1 Partikelgrößenverteilung nach Vermahlung mit unterschiedlichen Mühlentypen.....	107

C TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 4-1 Temperaturprofil des Stickstoffaufschlusses.....	25
Tabelle 4-2 Verwendete Mühlentypen.....	27
Tabelle 4-3 Verwendete Chemikalien in der Biomassevorbehandlung.....	27
Tabelle 4-4 Reaktionsbedingungen der Mikrowellenversuche	29
Tabelle 4-5 Reaktionslösungen für die Mikrowellenversuche	30
Tabelle 4-6 HPAEC-PAD Komponenten.....	32
Tabelle 4-7 Trennbedingungen der HPAEC-PAD.....	33
Tabelle 4-8 Verwendete Zuckerstandards für die Quantifizierung.....	33
Tabelle 4-9 HPLC-RI/UV Komponenten.....	34
Tabelle 4-10 Trennbedingungen HPLC-RI/UV	34
Tabelle 4-11 Verwendete Nebenproduktstandardts für die Quali- und Quantifizierung	35
Tabelle 5-1 Charakterisierung von Weizenkaff- nach NREL-Methoden, Angaben in g/g Biomasse.....	38
Tabelle 5-2 Charakterisierung von Weizenstroh nach NREL-Methoden, Angaben in g/g Biomasse	39
Tabelle 5-3 Charakterisierung weiterer Biomassen nach NREL-Methoden, Angaben in g/g Biomasse, n.a. : nicht bekannt, *: Lignin + Säureunlöslicher Rückstand	41
Tabelle 5-4 Temperatur/Zeit Schema für thermochemische Vorbehandlungen.....	50
Tabelle 5-5 Verzuckerungsgrade der säurekatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 0,1 % H ₂ SO ₄ und anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4,8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	51
Tabelle 5-6 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der säurekatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 0,1 % H ₂ SO ₄ bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze; Analysierte Parameter siehe Tabelle 4-11).....	52
Tabelle 5-7 Verzuckerungsgrade der säurekatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 0,65 % H ₂ SO ₄ und anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4,8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	53
Tabelle 5-8 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der säurekatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 0,65 % H ₂ SO ₄ bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen	

(T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze; Analysierte Parameter siehe Tabelle 4-11).....	54
Tabelle 5-9 Verzuckerungsgrade der neutralen Vorbehandlung LHW von Kaff mit anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	57
Tabelle 5-10 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der neutralen Vorbehandlung LHW von Kaff bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze; Analysierte Parameter siehe Tabelle 4-11).....	58
Tabelle 5-11 Verzuckerungsgrade der basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 5 % NH ₃ und anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	59
Tabelle 5-12 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der Basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 5 % NH ₃ bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze	60
Tabelle 5-13 Verzuckerungsgrade der basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 10 % NH ₃ und anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	61
Tabelle 5-14 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der Basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 5 % NH ₃ bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze	61
Tabelle 5-15 Verzuckerungsgrade der basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 5 % NaOH und anschließender, enzymatischen Hydrolyse (5 % Feststoffanteil, pH 4.8, 100 FPU, 50 °C, 600 rpm, 96 h) bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, DOS: Verzuckerungsgrad, SD: Standardabweichung).....	62
Tabelle 5-16 Gebildete Degradationsprodukte [g/L] der Basenkatalysierten Vorbehandlung von Kaff mit 5 % NH ₃ bei verschiedenen Zeiten und Temperaturen (T: Temperatur, t: Zeit, n.d.: < Nachweisgrenze	63

D SYMBOL UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Symbol	Bedeutung
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
Au	Gold
d	Tage
DNS	Dinitrosalicylsäure
DOS	Engl. Verzuckerungsgrad
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe
FPU	Filter Paper Unit (Maß der Cellulaseaktivität)
FS	Feststoffgehalt
g	Gramm
GER	Deutschland
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HMF	5-Hydroxy-Methyl-Furfural
HPAEC-PAD	Engl. Hochdruck- Ionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Engl.: Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
i.d.R.	In der Regel
JPN	Japan
kg	Kilogramm
L	Liter
LC	Engl. Flüssigkeits-Chromatographie
LHW	Liquid Hot Water
Lt.	Lateinisch
M	Molar
min	Minuten
mio.	Millionen
mm	Millimeter
n.a.	Engl. Nicht bekannt
n.d.	Nicht detektiert
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge

NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe
NH ₃	Ammoniak
nm	Nanometer
Nm	Newton Meter
o.g.	Oben genannten
p.a.	lt. zur Analyse
POAP	Production of Organic acids for polymers
PP	Polypropylene
RI	Engl. Brechungsindex
RPM	Engl. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur (entspricht 21 °C)
u.a.	Unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von America
UV	Engl. Ultra-Violett
z.T.	Zum Teil

E CHEMIKALIEN

Chemikalie	Lieferant	Reinheit
Natriumacetat	VWR Chemicals	p.a.
Ammoniumsulfat	Sigma	> 99 %
Buchenholzxylen	Sigma	k. A.
Cellulose	Fluka	k. A.
Citronensäure	Riedel de Haën	> 99 %
3,5-Dinitrosalicylsäure	Aldrich	≥ 98 %
Essigsäure	Roth	100 %, Rotipuran®
Ethanol	Roth	≥ 99,5 %
Hexan	Roth	≥ 99,5 %, Rotisolv®
Lävulinsäure	Sigma	> 97 %
Lignin (alkalisch)	Aldrich	k. A.
Lignin (Organosolv)	ASA Spezialenzyme	k. A.
Natriumacetat	Sigma	wasserfrei
tri-Natriumcitrat-dihydrat	Merck	reinst
Natronlauge	Roth	≥ 99 %
Oxalsäure-dihydrat	Merck	reinst
Phosphorsäure	Sigma	85%
Rinderserumalbumin	Sigma	99%
Salpetersäure	Merck	65%
Salzsäure	Merck	37 %, rauchend
Schwefelsäure	Roth	98 %, Rotipuran®
TRIS	Merck	99,9 %, p. a.